

NEUSA JÚLIA PANSARDI PAVANI

"EFEITO DA 3,4-DIAMINOPIRIDINA NA DESSENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR DA PLACA TERMINAL PROVOCADA POR VÁRIOS AGONISTAS. NATUREZA DO ANTAGONISMO ENTRE AS AMINOPIRIDINAS E ÍON CÁLCIO NO FENÔMENO DA DESSENSIBILIZAÇÃO".

Orientador: Prof.Dr. OSWALDO VITAL BRAZIL

TESE DE DOUTORADO

Apresentada à

Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas
UNICAMP - Cursos de Pós-Graduação

1983

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ÍNDICE

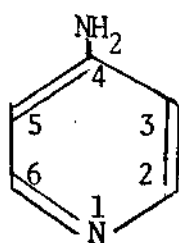
Página

I- INTRODUÇÃO.....	01
II- DESSENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR COLINÉRGICO DA PLACA TERMINAL.....	06
III- MATERIAL E MÉTODO.....	24
IV- RESULTADOS.....	32
V- DISCUSSÃO.....	80
VI- CONCLUSÕES.....	89
VII- RESUMO.....	91
VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

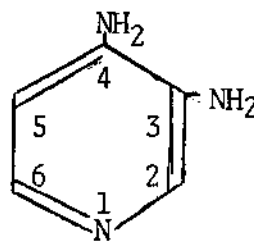
I - I N T R O D U Ç Ã O

I- INTRODUÇÃO

As monoaminopiridinas e as diaminopiridinas produzem aumento na liberação de neurotransmissores em sinapses centrais e periféricas (FASTIER e Mc DOWALL, 1958; VOHRA e PRADHAN, 1964, VOHRA et al., 1965). Na junção neuromuscular, aumentam consideravelmente o número dos quanta de acetilcolina liberados por impulso nervoso (MOLGÓ et al., 1977; DURANT e MARSHALL, 1978 ; JACOBS e BURLEY, 1978). As mais ativas e estudadas são a 4-aminopiridina e a 3,4-diaminopiridina, sendo esta a mais potente (MOLGÓ et al., 1980). Apresentam as seguintes fórmulas estruturais:



4-aminopiridina



3,4-diaminopiridina

O efeito produzido pelas aminopiridinas na liberação de acetilcolina das terminações nervosas é atribuído a aumento do influxo dos íons cálcio causado por dois mecanismos distintos: 1) bloqueio dos canais do potássio (PELHATE e PICHON, 1974; YEH et al., 1976 a, b; ULBRICHT e WAGNER, 1976 ; SCHAUF et al., 1976), o que provoca aumento da duração do potencial de ação com o consequente maior influxo de íons cálcio para as terminações nervosas motoras (HARVEY e MARSHALL, 1977; ILLES e THESLEFF, 1978; LUNDH, 1978), 2) ação direta das aminopiridinas na cinética dos canais do cálcio voltagem-sensitivos das terminações nervosas (LUNDH e THESLEFF, 1977).

Em razão de aumentarem a liberação de ace-

tilcolina pelos impulsos nervosos, as aminopiridinas revertem o bloqueio causado pelas drogas curarizantes competitivas (VOHRA e PRADHAN, 1964; LEMEIGNAN e LECHAT, 1967; SOBEK et al., 1968 ; HARVEY e MARSHALL, 1977), pelo magnésio e antibióticos aminoglicosídeos (SOBEK et al., 1968), assim como pela toxina botulínica (LUNDH et al., 1977). Ensaios clínicos demonstraram que também melhoram a transmissão neuromuscular em pacientes portadores de síndrome miastênica (LUNDH et al., 1977) e de miastenia grave (LUNDH et al., 1979).

Em 1979 VITAL BRAZIL e colaboradores (1979 b) verificaram que a 4-aminopiridina é também capaz de antagonizar o bloqueio neuromuscular produzido pela crotoxina, principal toxina da peçonha de cascavel sul-americana. Esta neurotoxina, de ação pré-sináptica predominante, também atua na membrana sub-sináptica bloqueando a ação da acetilcolina e outras drogas agonistas (VITAL BRAZIL, 1966; VITAL BRAZIL et al., 1979 a). Constataram igualmente nessa pesquisa (1979 b) que a 4-aminopiridina também antagoniza a inibição produzida pela crotoxina sobre a despolarização das placas terminais causada pelo carbacol. Por outro lado, pesquisando a ação da crotoxina em preparações de órgão elétrico de Torpedo marmorata e de Electrophorus electricus, BON e colaboradores (1979) verificaram que esta toxina, embora não se combine nos sítios receptivos do receptor em que a acetilcolina atua, estabiliza a proteína receptora em uma conformação que exibe alta afinidade para os agonistas, isto é, em estado semelhante ao de dessensibilização (KATZ e THESLEFF, 1957; RANG e RITTER, 1970 ; HEIDMANN e CHANGEAUX, 1979 a). Isto levou VITAL BRAZIL e colaboradores (VITAL BRAZIL e FONTANA, 1982; VITAL BRAZIL et al., 1982)

a investigar o efeito da 4-aminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal causado pela interação prolongada de um agonista - o carbacol-com o receptor. Constataram nessa pesquisa que a 4-aminopiridina impede a dessensibilização do receptor se adicionada ao banho antes do agonista e reverte-o à sua forma de repouso, não dessensibilizada, se adicionada após a ocorrência da dessensibilização. Verificaram ainda que o íon cálcio antagoniza o efeito da 4-aminopiridina sobre a dessensibilização dos receptores (VITAL BRAZIL et al., 1982).

A presente investigação, prosseguimento da anterior acima referida, teve por objetivo contribuir para o esclarecimento de alguns aspectos adicionais relativos àqueles achados, tais como verificar: a) se o efeito inibitório sobre a dessensibilização é também produzido por outra droga do grupo, a 3,4-diaminopiridina e a relação de atividade desta e da 4-aminopiridina quanto ao efeito na dessensibilização, b) se o efeito independe do agonista causador da dessensibilização e c) a natureza do antagonismo entre o íon cálcio e as aminopiridinas no fenômeno da dessensibilização.

O mecanismo da dessensibilização não se acha totalmente esclarecido. MANTHEY formulou hipótese na qual o cálcio desempenha papel fundamental em sua gênese. Seria, portanto, importante, dada as implicações que pode ter no mecanismo de ação das aminopiridinas e no da dessensibilização esclarecer se o antagonismo referido é funcional ou competitivo. Por outro lado, a propriedade de inibir a dessensibilização do receptor colinérgico da placa terminal, poderá tornar as aminopiridinas importantes instrumentos de pesquisa em estudos relativos ao comple-

xo receptor-canal iônico. A verificação referida em b é indispensável para tal finalidade. Se as relações de atividades entre a 3,4-diaminopiridina e 4-aminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal e no bloqueio dos canais de potássio forem as mesmas, isto poderá sugerir afinidade por grupos aniônicos idênticos nos canais de potássio e no complexo receptor-canal iônico.

II - D E S S E N S I B I L I Z A Ç Ã O

II- DESSENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR COLINÉRGICO DA PLACA TERMINAL

THESLEFF em 1955 (1955 a, b) verificou que a despolarização das placas terminais de preparações neuromusculares isoladas (nervo ciático-sartório de rã, nervo frênico-diafragma de rato) consequente à adição de agonistas ao banho é transitória, isto é, que elas voltam a se repolarizar a despeito da presença dessas substâncias. Constatou também que o bloqueio da transmissão neuromuscular se desenvolve durante a fase de despolarização mas persiste após a repolarização das placas terminais, sendo somente restaurado após a retirada dos agonistas pela lavagem da preparação. THESLEFF (1955 a, b) concluiu que o bloqueio neuromuscular causado pela interação prolongada dos receptores com a acetilcolina e análogos não é devido à persistência da despolarização das placas terminais, mas à abolição da sensibilidade desas regiões à ação despolarizante da acetilcolina e agonistas em geral. Este fenômeno recebeu a denominação de "dessensibilização" (KATZ e THESLEFF, 1957) ou "inativação" (NASTUK, 1967) do receptor da placa terminal.

A dessensibilização do receptor é processo bifásico (FELTZ e TRAUTMANN, 1980, 1982, ANWYL e NARAHASHI, 1980, CLARK e ADAMS, 1981). Desenvolve-se em uma fase rápida e outra lenta. A instalação da primeira dá-se em poucos segundos ou mesmo em fração de segundos enquanto a da segunda processa-se em dezenas de segundos ou de minutos. A recuperação, isto é, o desaparecimento da dessensibilização pela retirada do agonista, também difere nas duas fases: o seu tempo médio é da ordem de segundos na fase rápida, de minutos na lenta. A fase rápida é apenas revela-

da com o uso de certas técnicas de aplicação do agonista. A ocorrência da fase lenta depende da persistência do agonista na biofase por tempo relativamente longo, superior a 2 minutos segundo FELTZ e TRAUTMANN (1982).

Fenômeno de dessensibilização idêntico ao da placa terminal tem sido observado em preparações de órgãos elétricos de peixes, tais como v.g. de várias espécies de Torpedo (BENNETT et al., 1961; MOREAU e CHANGEAUX, 1976; SUGIYAMA et al., 1976) e do Electrophorus electricus (LARMIE e WEBB, 1973 ; LESTER et al., 1975). Também, neurônios de moluscos, células de Renshaw da medula espinhal de mamíferos e músculos lisos tornam-se menos sensíveis à acetilcolina e análogos pelo contato prolongado com estas substâncias (MAGAZANIK e VYSKOČIL, 1976). Contudo, pelo menos o mecanismo de dessensibilização de músculos lisos é totalmente diferente do da placa terminal (BURGEN, 1982).

Os métodos usados no estudo da dessensibilização do receptor da placa terminal podem ser divididos quanto ao processo de aplicação dos agonistas e quanto à avaliação da dessensibilização. No que se refere à aplicação, o agonista pode ser adicionado ao banho contendo a preparação com o auxílio de pipeta ou a preparação perfundida com a solução nutritiva contendo o agonista. MANTHEY (1966) introduziu a técnica de superfusão, para a obtenção mais rápida da dessensibilização, isto é, perfundiu diretamente a placa terminal em que estava acompanhando o processo de dessensibilização. Outro método, originalmente utilizado por KATZ (1957) e DEL CASTILLO e KATZ (1955 e 1957) consiste na aplicação microiontoforética do agonista. Neste, o agonista é liberado por meio de pulsos isolados longos ou iterativos mais curtos (KATZ e THESLEFF, 1957, MAGAZANIK e VYSKOČIL, 1973,

ANWYL e NARAHASHI, 1980, FELTZ e TRAUTMANN, 1982). Podem ser utilizadas também micropipetas de duplo cano, sendo que um produz liberação rápida do agonista através de pulsos de curta duração causando despolarização transitória da membrana sub-sináptica e o outro, por intermédio de pulsos mais prolongados causa liberação prolongada do mesmo condicionando a dessensibilização (KATZ e THESLEFF, 1957).

A avaliação da dessensibilização do receptor colinérgico pode ser feita por vários processos: a) determinação do potencial de membrana na região das placas terminais, tomando-se como guia de dessensibilização a repolarização da membrana sub-sináptica (NASTUK e GISSEN, 1965; NASTUK e PARSONS, 1970) ; b) medida da resistência efetiva da membrana, sendo, neste caso, o aumento da resistência após a queda inicial, para valores próximos ao controle, o critério de avaliação da dessensibilização (MANTHEY, 1966); c) medida da corrente necessária para manutenção do potencial de membrana a determinado nível (clampeamento de voltagem) em uma placa terminal (ADAMS, 1975, FELTZ e TRAUTMANN, 1980, 1982, PENNEFATHER e QUASTEL, 1982). A redução da corrente ou seu desaparecimento após o aumento consequente à aplicação do agonista indica a dessensibilização dos receptores.

Inúmeros fatores podem alterar a intensidade e o ritmo da dessensibilização da membrana sub-sináptica e de preparações do órgão elétrico de peixes.

Influência do método de aplicação dos agonistas. A aplicação do

agonista pelos métodos usuais (adição ao banho ou perfusão da preparação com solução que o contenha) permite apenas revelar a fase lenta da dessensibilização. A fase rápida é revelada com o uso da aplicação microiontoforética do agonista. Pode também ser posta em evidência com o emprêgo de técnicas de superfusão local que permita alterar em poucos segundos a solução que banha as placas terminais (PENNEFATHER e QUASTEL, 1982). A recuperação não depende do processo de aplicação mas da duração da dessensibilização, isto é, da fase em que se encontra a dessensibilização.

Influência da concentração e natureza do agonista. A dessensibilização é concentração-dependente: tanto sua intensidade quanto a rapidez de seu desenvolvimento depende diretamente da concentração da acetilcolina e agonistas em geral (KATZ e THESLEFF, 1957; NASTUK e GISSEN, 1966; GISSEN e NASTUK, 1967; NASTUK e PARSONS, 1970; ANWYL e NARAHASHI, 1980). O ritmo de recuperação, entretanto, da sensibilidade original após a retirada da droga é independente da concentração do agonista e da intensidade da dessensibilização (KATZ e THESLEFF, 1957). Depende conforme já referido da fase em que se encontra a dessensibilização.

Com respeito à natureza do agonista no desenvolvimento da dessensibilização, os resultados obtidos por diferentes autores não são concordes. THESLEFF (1955 a) não registrou diferenças acentuadas no ritmo de dessensibilização provocada, na preparação ciático-sartório da rã, pela acetilcolina, decametônio, succinilcolina e nicotina. KATZ e THESLEFF (1957) e MAGAZANIK (1968) também não encontraram diferenças substanciais no desenvolvimento da dessensibilização provocada pela aplicação

microiontoforética de acetilcolina, carbacol e succinilcolina (KATZ e THESLEFF) ou de butirilcolina, tetrametilamônio, decametônio e suberildicolina (MAGAZANIK). Mais recentemente ANWYL e NARAHASHI (1980) registraram tempos médios de dessensibilização não significativamente diferentes (9,2; 9,0; 9,4; 9,5 segundos) para concentrações equipotentes de acetilcolina, acetiltiocolina, tetrametilamônio e feniltrimetilamônio. Contudo, segundo GISSEN e NASTUK (1966) e RANG e RITTER (1970), alguns agonistas como o feniltrimetilamônio e C_{13} -bis-trimetilamônio, causam mais rápida dessensibilização do que outros como o carbacol e a succinilcolina. Por outro lado, MAGAZANIK e VYSKOCIL (1976) sugerem que a potência em produzir dessensibilização de doses equivalentes dos agonistas esteja relacionada aos parâmetros cinéticos de abertura dos canais iônicos. Assim a acetiltiocolina que induz abertura extremamente breve dos canais ($\tau=0,12$ ms) apresenta em concentração equipotente, menor potência dessensibilizante do que a acetilcolina e suberildicolina cujos tempos de abertura do canal iônico são muito maiores, $\tau=1$ ms e $\tau=1,65$ ms respectivamente.

Influência do potencial de membrana. Estudos de KORDAS (1969) de MAGLEBY e STEVENS (1972 a,b) e de MAGAZANIK e VYSKOCIL (1970, 1973, 1975) demonstraram que o desenvolvimento da dessensibilização depende do potencial de membrana, sendo que a hiperpolarização da membrana pós-sináptica o acelera e a despolarização o retarda. No entanto, a dependência do desenvolvimento da dessensibilização relativamente ao potencial de membrana, não é absoluta. MANTHEY em 1966 demonstrou que a dessensibilização pode ocorrer em fibras despolarizadas por altas concentrações de potássio na solução nutritiva.

Influência da temperatura. KORDAS (1972); MAGLEBY e STEVENS (

1972 b), e MAGAZANIK e VYSKOČIL (1973, 1975) observaram que a diminuição da temperatura lentifica o desenvolvimento da dessensibilização.

Influência de íons. O aumento da concentração de íon cálcio na solução nutritiva potencializa o processo de dessensibilização, acelerando seu desenvolvimento (MANTHEY, 1966, 1970, 1972; NASTUK e LIU, 1966; MAGAZANIK, 1968; MAGAZANIK e VYSKOČIL, 1970; LAMBERT e PARSONS 1970; NASTUK e PARSONS, 1970; PARSONS et al., 1971; COCHRANE et al. 1972), enquanto que sua diminuição ou ausência retarda seu aparecimento (MANTHEY, 1966, 1970, 1972; MAGAZANIK, 1968). O aumento do íon potássio reduz o ritmo de seu desenvolvimento (MANTHEY, 1966, 1972), bem como o aumento da concentração do íon sódio (MANTHEY, 1966). O aumento quer do potássio, quer do sódio é capaz de antagonizar a ação aceleradora do cálcio no processo de dessensibilização (MANTHEY, 1966; MAGAZANIK, 1968).

NASTUK e PARSONS (1970) constataram que o Mg^{++} apresenta discreta ação aceleradora da dessensibilização quando na ausência de Ca^{++} na solução nutritiva. Contudo, é capaz de inibir a ação aceleradora da dessensibilização causada por aquele íon. Também acharam que o Mn^{++} não bloqueia a ação aceleradora do Ca^{++} .

Usando a técnica de duplo-cano para produzir a dessensibilização, MAGAZANIK e VYSKOČIL (1970) colocaram na seguinte ordem crescente de potência os cations polivalentes capazes de aumentar a velocidade de dessensibilização: $Mg^{++} \ll Ca^{++} \leq Ba^{++} < Sr^{++} \ll Al^{+++} \ll La^{+++}$.

Entretanto, KATZ e THESLEFF (1957) cujas experiências, em sua maioria, foram levadas a efeito em solução de Ringer com 9 mM de cálcio, assinalaram que a concentração eleva

da deste íon não influenciava as respostas à aplicação microiontoforética de acetilcolina. Também, ANWYL e NARAHASHI (1980) não encontraram diferenças significativas no tempo médio de dessensibilização quer pela mudança na concentração de cálcio de 0 a 50 mM na solução nutritiva quer pela perfusão da preparação (diafragma isolado e cronicamente desnervado de rato) com agentes que aumentam o teor de cálcio intracelular (2,4-dinitrofenol e os ionóforos cálcicos X-537A e A 23187).

Influência de neurotoxinas. MILEDI e POTTER (1971) e LESTER (1972) em estudos com a α -bungarotoxina (α -BuTX), antagonista de ação irreversível, demonstraram que, a ligação desta neurotoxina aos receptores colinérgicos diminui progressivamente quando estes se tornam dessensibilizados. De seus resultados concluíram que há impossibilidade de a α -BuTX fixar-se nos receptores dessensibilizados.

Estudos feitos em músculos pré-tratados com a α -BuTX e a neurotoxina N_3 da peçonha Naja naja siamensis aplicadas intracelularmente (MAGAZANIK e VYSKOČIL, 1972, VYSKOČIL e MAGAZANIK, 1972) demonstraram que estas toxinas aceleram a dessensibilização produzida pela acetilcolina. Estes estudos sugerem que estas neurotoxinas exerçam seus efeitos ligando-se a outros sítios, que não os receptivos para a acetilcolina da membrana pós-juncional, sítios estes localizados na superfície interna da mesma (MAGAZANIK e VYSKOČIL, 1972). Além disso, MAGAZANIK e VYSKOČIL (1973) também sugerem, que a α -BuTX colocada no banho acelere igualmente a dessensibilização. No entanto, esse último efeito poderia ser devido a uma obstrução parcial do canal iônico produzido pela α -BuTX. Esta obstrução parcial é sugerida por KARLIN (1980, Fig. 2B, pg 223).

Pesquisando as ações pós-sinápticas da ciguatera e da crotoxina, BON e CHANGEAUX (1977) e BON e colaboradores (1979) verificaram que estas toxinas bloqueiam a despolarização causada pelo carbacol em eletroplacas isoladas de Electrophorus electricus e o aumento do fluxo de Na^+ e K^+ causado pelos agonistas colinérgicos em microvesículas excitáveis ricas em receptores, preparadas a partir do órgão elétrico do Torpedo marmorata. Embora não se combinem nos sítios receptivos do receptor em que a acetilcolina atua, estabilizam a proteína receptora em uma conformação que exibe alta afinidade para os agonistas. Segundo pesquisas de KATZ e THESLEFF (1957), RANG e RITTER (1970) e HEIDMANN e CHANGEAUX (1979 a) esta conformação do receptor corresponde à sua forma "dessensibilizada" ou "inativa".

VITAL BRAZIL e colaboradores (1979 b) demonstraram que a 4-aminopiridina é capaz de antagonizar a ação pós-juncional da crotoxina, o que confirma que esta toxina atua produzindo a dessensibilização do receptor colinérgico. Com efeito, a 4-aminopiridina é capaz de reverter o receptor de sua forma dessensibilizada para a de repouso (VITAL BRAZIL e FONTANA, 1982, VITAL BRAZIL, et al., 1982).

Segundo MARLAS e BON (1982) o agente que produz a transformação do receptor da conformação de baixa para a de alta afinidade resulta da atividade fosfolipásica do componente B da crotoxina. Seria provavelmente ácido graxo que, por si só, é capaz de produzir este fenômeno: os ácidos graxos antagonizam os efeitos dos agonistas colinérgicos em eletroplacas (BRISSON et al., 1975).

Influência de outros compostos orgânicos: Várias substâncias apresentam a propriedade de acelerar o desenvolvimento da dessensi-

bilização. Entre elas encontram-se: SKF-525A (SUAREZ-KURTZ et al., 1969; MAGAZANIK, 1970), clorpromazina (MAGAZANIK, 1970), anti-histamínicos tais como, fenil-hidramina e prometazina, além do propranolol, certos anestésicos locais, (procaína e a lidocaína) (MAGAZANIK e VYSKOCIL, 1976) e as drogas anticolinesterásicas fisostigmina e a neostigmina (KIM e KARCZMAR, 1967). Agentes anticolinérgicos tais como o mesphenal também aceleram a dessensibilização (MAGAZANIK, 1971) embora a atropina não o faça (MAGAZANIK, 1968). A d-tubocurarina também não interfere no desenvolvimento da dessensibilização (MAGAZANIK, 1968). É bem sabido que a d-tubocurarina antagoniza a ação dos agonistas. Entretanto não afeta o processo de dessensibilização se o nível do agonista aplicado é aumentado para dar a mesma despolarização que àquela produzida na sua ausência (MAGAZANIK e VYSKOCIL, 1973). Em contraste, a dessensibilização é reduzida pela nistatina e outros antibióticos de estrutura poliênica (MAGAZANIK, 1968), catecolaminas (STAMENOVIC, 1968) e pelo metoxiambenônio (KIM e KARCZMAR, 1967).

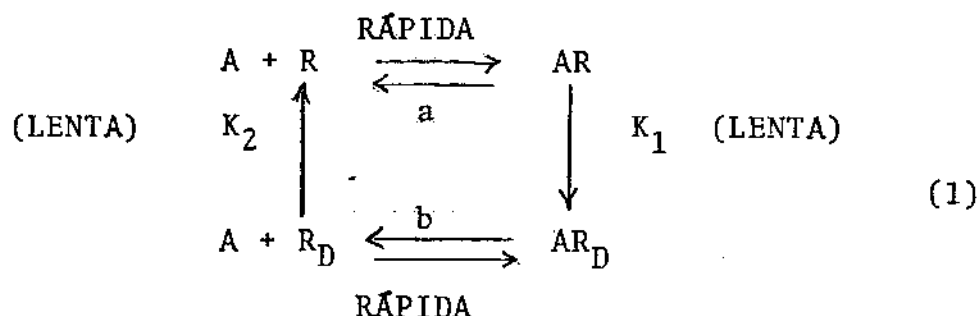
Alguns compostos bloqueiam o canal iônico tais como a histrionicotoxina (ALBUQUERQUE et al., 1974), a quinacrina (TSAI et al., 1979) e anestésicos locais (ADAMS, 1976; RUFF, 1977; HEIDMANN e CHANGEAUX, 1979 b). Entretanto, este efeito resulta provavelmente de obstrução do canal iônico por fixação dessas substâncias em seu interior.

Várias hipóteses foram formuladas para explicar o fenômeno da dessensibilização. Alguns esquemas propostos requerem a participação de energia. Desde que a dessensibilização foi demonstrada em membranas isoladas da eletroplaca de

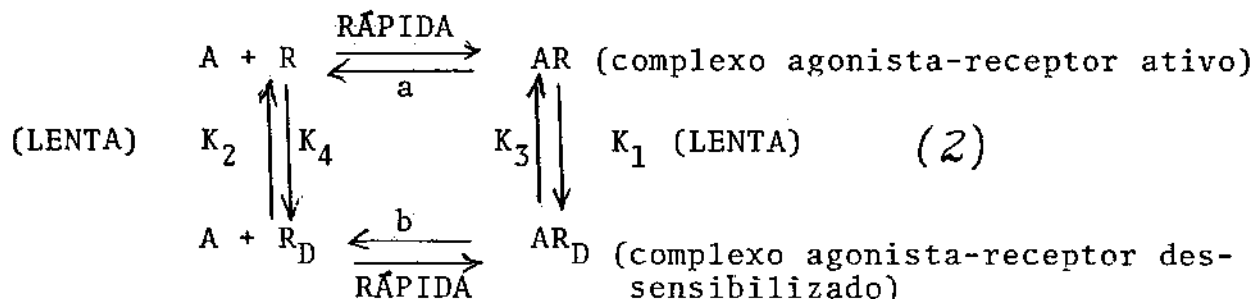
Torpedo, isto é, na ausência completa de células, todas aquelas hipóteses que requerem a participação de energia devem ser afastadas. O esquema cíclico proposto por KATZ e THESLEFF em 1957 é ainda hoje o mais aceito. Segundo estes pesquisadores os receptores existem, mesmo na ausência de agonistas, sob duas formas: R e R_D . A interação de um agonista (A) com R , isto é, receptor em sua forma não dessensibilizada, dá lugar à formação de um complexo AR ativo, o qual promove o aumento da permeabilidade da membrana sub-sináptica aos íons sódio e potássio. Em outras palavras, promove a abertura do canal iônico ou ionóforo. A ligação do agonista (A) com R_D , isto é, como receptor em sua forma inativa ou dessensibilizada e que existe em condições de repouso em uma proporção muito pequena, promove a formação do complexo AR_D inativo, o qual é incapaz de alterar a permeabilidade da membrana sub-sináptica aos íons sódio e potássio. A formação dos complexos AR e AR_D são extremamente rápidas. Contudo, KATZ e THESLEFF supõem que AR transforme-se em AR_D e R_D em R sendo, entretanto lentas essas transformações. Assim, quando um agonista interliga-se por tempo prolongado com o receptor em sua forma ativa, o complexo ativo formado (AR) vai aos poucos transformando-se no complexo inativo (AR_D) e há também um aumento da proporção de R_D . Por outro lado, ao retirar-se o agonista, o receptor dessensibilizado lentamente transforma-se no receptor em sua forma ativa.

KATZ e THESLEFF propuseram dois esquemas cíclicos para explicar o fenômeno. Nos dois, o agonista combina-se rápida e reversivelmente com ambas as formas R e R_D , mas em um deles (representado em 1) o receptor combinado (AR) é transformado lenta e irreversivelmente para AR_D com uma constante de

dessensibilização K_1 , enquanto que o receptor livre R_D reverte para a forma R com uma constante de recuperação K_2 . Um esquema desta espécie requer energia suplementar para se manter um equilíbrio estável e por isso não pode ser aceito para explicar a dessensibilização.



O outro (representado em 2) é uma versão reversível da hipótese anterior e permite o equilíbrio termodinâmico sem fonte extra de energia.



Onde, K_1 e K_4 são constantes da dessensibilização, K_3 e K_2 constantes de recuperação, a e b constantes de afinidades.

Ainda, segundo KATZ e THESLEFF, os resultados podem ser bem ajustados se se considera: a) a afinidade do agonista (A) maior para o receptor dessensibilizado R_D que para o receptor ativo R ($b > a$); b) a constante de dessensibilização deve ser maior que a constante de recuperação ($K_1 > K_3$); c) a transformação do receptor inativo (R_D) para o ativo (R) deve ser

maior que o inverso ($K_2 > K_4$). Caso contrário, mais receptores estariam no estado dessensibilizado, mesmo na ausência do agonista.

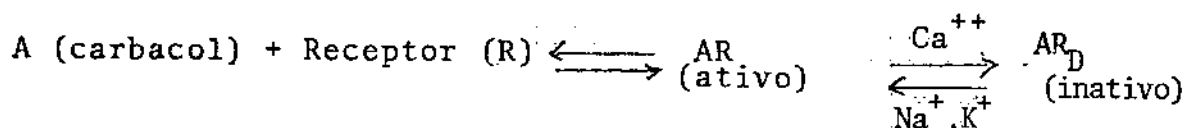
O modelo cíclico de KATZ e THESLEFF (1957) não esclarece quais os eventos moleculares pelos quais o receptor ativado é convertido para a forma inativa (dessensibilizada) e desta para a de repouso (NASTUK, 1977).

NASTUK e GISSEN (1966) sugeriram um modelo de múltiplos-sítios, isto é, a existência no receptor de mais de um sítio de ligação para o agonista. A combinação inicial do receptor com uma molécula do agonista produz rapidamente alteração conformacional a qual origina aumento na condutância da membrana. Como resultado desta alteração conformacional, sítios secundários na molécula do receptor tornam-se expostos e mostram aumentada afinidade para o agonista. A reação do agonista com estes sítios secundários causaria a inativação do receptor (dessensibilização). Neste modelo de múltiplos-sítios, a ação dos íons cálcio pode ser entendida supondo-se que eles reajam com os sítios de ligação secundários, alguns dos quais podem estar localizados no lado interno da membrana pós-juncional (NASTUK e PARSONS, 1970). De fato, durante a ativação da membrana pós-juncional há aumento da permeabilidade ao cálcio (TAKEUCHI, 1963).

Parece que o cálcio desempenha importante papel tanto na regulação da sensibilidade pós-juncional para os agonistas (NASTUK e LIU, 1966) quanto na dessensibilização do receptor.

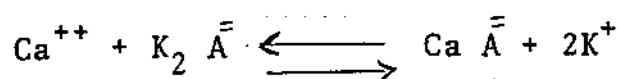
MANTHEY demonstrou em 1966 que a velocidade de dessensibilização depende das concentrações de cálcio só-

dio e potássio no líquido extracelular. Nessa pesquisa como nas subsequentes, MANTHEY utilizou o sartório de Rana pipiens e, como agonista, o carbacol. A dessensibilização foi acompanhada pela determinação do potencial de membrana e sua resistência efetiva na região da placa terminal. Este pesquisador demonstrou que o cálcio acelera consideravelmente o processo de dessensibilização, sendo que seu aumento de 0 para 10 mM aumenta em aproximadamente 7 vezes a velocidade de desenvolvimento da mesma, ao passo que o aumento do sódio e do potássio antagoniza o efeito daquele íon. MANTHEY propõe duas explicações para o fenômeno. A primeira postula a conversão do receptor de sua forma efetiva para a inativa ou dessensibilizada. Portanto, o cálcio seria necessário para a conversão de AR para AR_D no esquema de KATZ e THESLEFF, enquanto os cations monovalentes sódio e potássio promoveriam a reação inversa, tal como se segue:



Outra possibilidade aventada por MANTHEY foi a de que o efeito do cálcio decorresse da ação bem conhecida desse íon de estabilizar as membranas celulares. Em pesquisa posterior (1970), entretanto, MANTHEY verificou que o efeito do cálcio no processo de dessensibilização não é imediato, manifestando-se apenas cerca de 13 segundos após o início da perfusão da placa terminal com a solução de carbacol. Baseado nesse resultado, formulou a hipótese de que o sítio em que atua se bem que, talvez na membrana, não é a ele acessível quando o receptor não se encontra ativado. A ativação deste, a par de aumentar a permeabilidade aos íons sódio e potássio, também o faz em relação

aos íons cálcio. O aumento da permeabilidade a estes últimos permitiria que atingissem o sítio em que atuam promovendo a dessensibilização do receptor. Em 1972 reinvestigou o antagonismo cálcio-potássio no fenômeno da dessensibilização, formulando a hipótese de que a inativação do receptor seja causada por mecanismo de troca-iônica entre um íon cálcio e dois íons potássio em sítio aniônico divalente ($A^{=}$) somente acessível a cations do meio externo após o aumento da condutância da membrana resultante da interação agonista-complexo receptor-canal iônico:



NASTUK e PARSONS (1970) sugerem que esse sítio esteja localizado na superfície interna da membrana.

O modelo proposto por HEIDMANN e CHANGEAUX (1979 a) para explicar em bases estruturais moleculares os fenômenos de ativação e inativação do complexo receptor-canal iônico fundamenta-se na concepção de controle alostérico de inibição e ativação dos catalizadores biológicos desenvolvida em enzimologia e na de KATZ e THESLEFF (1957) acima reproduzida, referente aos processos de ativação e dessensibilização do receptor da placa terminal. Esse modelo apresenta as características que abaixo são referidas.

1) A unidade funcional elementar (ou complexo receptor-canal iônico), responsável pelo aumento da permeabilidade a cations produzido pelos agonistas colinérgicos compõem-se de dois elementos estruturalmente distintos: o receptor e o ionóforo ou canal iônico; o primeiro destinado à ligação do neurotransmissor, o segundo à alteração seletiva da membrana subsináptica a certos íons (sódio, potássio e, em menor escala, cálcio).

cio).

2) A proteína receptora sensu stricto, constituída da associação de um certo número de cadeias polipeptídicas em molécula oligomérica, possui vários sítios receptivos para a acetilcolina.

3) O ionóforo que pode ser parte da proteína receptora ou unidade completamente distinta, encerra o canal iônico e sítio ou sítios em que se fixam certos compostos tais como os anestésicos locais amino-terciários e a histrionicotoxina dando lugar a bloqueio do aumento de permeabilidade a cations de modo não competitivo.

4) Quando a unidade funcional encontra-se na membrana, o sítio receptivo para agonistas e o ionóforo influenciam-se mutuamente. O complexo receptor-canal iônico pode existir em pelo menos três estados conformacionais interconvertíveis. Existem estes na ausência de substâncias a eles ligadas e independem da natureza dos compostos que com eles se combinam. Estes estados são o de repouso (R), o ativo (A) e o dessensibilizado (D). Diferenciam-se pela afinidade pelos agonistas e pelos antagonistas, pela afinidade pelos anestésicos locais e pela abertura do canal iônico. A afinidade para agonistas é menor no estado R (baixa afinidade) e maior no D (alta afinidade); a do estado A ocupa posição intermediária (média afinidade). Em contrapartida, a afinidade pelos antagonistas é menor no estado A do que nos R e D. A afinidade dos sítios de ligação dos anestésicos locais também difere nos três estados; nos D e A é maior do que no R. O ionóforo somente se encontra aberto quando o complexo acha-se no estado A. Os anestésicos locais ligam-se ao complexo em sua conformação A, bloqueando a permeabilidade aos ca-

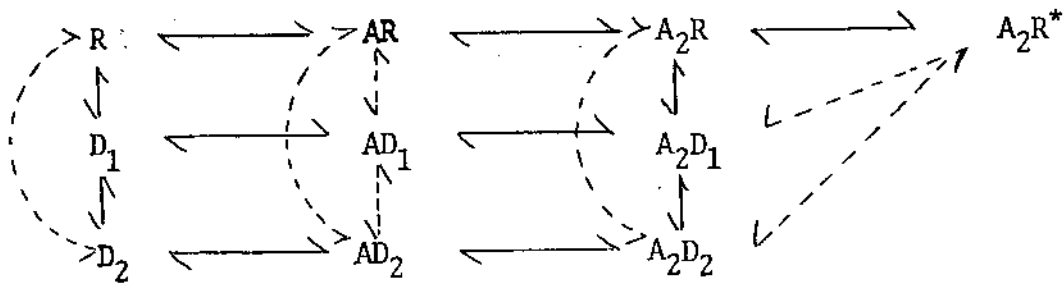
tions possivelmente por obstrução ("steric hindrance") do canal.

5) Na membrana em repouso, a grande maioria do complexo receptor-canal iônico encontra-se no estado R, uma pequena parte no D; o número do complexo no estado A é desprezível. Na vigência de ligação de uma determinada substância ao complexo, o equilíbrio desloca-se para o estado conformacional ao qual se combina preferencialmente quer a nível dos sítios receptivos para a acetilcolina quer a nível dos sítios em que os anestésicos locais se ligam. Entretanto, alguns estados podem aumentar, transitoriamente em número devido a vias preferenciais de conversão. Assim, a reação de ativação deve ser encarada como um aumento transitório do número do complexo em sua conformação A enquanto a de dessensibilização como o equilíbrio final da unidade funcional elementar no seu estado D.

Segundo HEIDMANN e CHANGEAUX (1979 b), os anestésicos locais podem ligar-se ao complexo nos seus estados conformacionais R, A e D, embora o façam em concentrações diferentes. Em concentrações maiores ligam-se aos sítios receptivos para acetilcolina. Em concentrações menores ligam-se a sítio no canal iônico, estando o complexo em seu estado conformacional A e obstruem o ionóforo. Atuam também, em concentrações menores, em sítio alostérico, aumentando como o íon cálcio o ritmo de dessensibilização do complexo, estabilizando-o no seu estado de alta afinidade para os agonistas.

FELTZ e TRAUTMANN (1982) propuseram modelo semelhante ao de KATZ e THESLEFF para explicar a dessensibilização do receptor da placa terminal com duas importantes modificações. A primeira postula a existência de duas formas distintas do receptor dessensibilizado, D_1 e D_2 . A dessensibilização rápida

da corresponderia à isomerização do receptor de R para D_1 . A transformação de D_1 em D_2 condicionaria o aparecimento da dessensibilização lenta. A recuperação rápida seria dada por $D_1 \longrightarrow R$ enquanto a lenta por $D_2 \longrightarrow R$ ou $D_2 \longrightarrow D_1 \longrightarrow R$. A recuperação lenta resultaria da grande afinidade dos agonistas por D_2 , muito maior do que por D_1 . A outra modificação consiste na admissão de que duas moléculas de agonista ligam-se a uma do receptor. Sabe-se, com efeito que o receptor compõe-se de várias sub-unidades ou cadeias, duas das quais, as sub-unidades α_1 encerram sítio de ligação para o agonista. O canal iônico somente se abriria quando os dois sítios se achassem ocupados. O esquema do modelo de FELTZ e TRAUTMANN é o seguinte:



Onde, R é o receptor ativo, A_2R^* complexo agonista-receptor ativo, D_1 e D_2 formas distintas de receptor dessensibilizado. As linhas contínuas representam as transições que se processariam mais comumente durante a ativação/dessensibilização e as pontilhadas, as que eventualmente poderiam tomar lugar.

III - MATERIAL E MÉTODO

III - MATERIAL e MÉTODO

Realizaram-se todas as experiências na preparação isolada nervo frênico-diafragma de rato, determinando-se o potencial de membrana na região das placas terminais com o emprego de microeletrodo intracelular. Como parâmetro guia da dessensibilização do receptor colinérgico foi adotado a repolarização da membrana pós-juncional que se segue à despolarização inicial, segundo processo semelhante ao utilizado por NASTUK e colaboradores (NASTUK e GISSSEN, 1965; NASTUK e PARSONS, 1970). As drogas em estudo foram adicionadas ao banho em pequenos volumes com o auxílio de pipeta.

Retiraram-se os hemidiafragmas esquerdos de ratos brancos (WISTAR) de peso variando entre 200 a 250g. Após anestesia dos animais pelo hidrato de cloral (240 mg/kg, via intraperitoneal) e sangria por secção dos vasos do pescoço, procedeu-se à retirada e montagem do hemidiafragma esquerdo com uma porção do nervo frênico correspondente, de acordo com a técnica descrita por BÜLBRING (1946). Os hemidiafragmas foram distendidos horizontalmente e fixados com alfinetes especiais com sua face torácica voltada para cima em uma cuba de perspex com 50 ml de capacidade. Utilizou-se como solução nutritiva a de TYRODE (composição em mM, NaCl 136,8, KCl 2,7, CaCl₂ 1,8, NaHCO₃ 11,9, MgCl₂ 0,25, NaH₂PO₄ 0,3, glicose 11,0) e fez-se a oxigenação com borbulhamento de carbogênio (95% de oxigênio e 5% de gás carbônico). A temperatura do banho foi mantida a 37°C.

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA

Para a determinação dos potenciais de membra

na empregaram-se micromanipulador ZEISS para aumento de até 40 vezes e osciloscópio TEKTRONIX 5103N com módulos 5A 22N "DIFFERENTIAL AMPL" e 58 12N "DUAL TIME BASE". O microeletrodo através de sua extremidade posterior era colocado em contacto com um filamento de prata cloretado contido no interior de um pequeno tubo de vidro preenchido com ágar e sustentado pelo braço do micromanipulador. Este filamento de prata achava-se, através de fio condutor, ligado a um seguidor catódico, em comunicação com o canal do osciloscópio. O eletrodo indiferente constituído por fio de prata espiralado e mantido, dentro de tubo de vidro preenchido com ágar era mergulhado na solução nutritiva da cuba de perspex e conectado por fio condutor a um gerador de impulsos capaz de fornecer sinais de 100, 20, 5, 1 e 0,2 mV. Toda a aparelhagem era mantida dentro de gaiola de FARADAY montada sobre mesa rígida de cimento, fixada ao solo a fim de evitar vibrações. O circuito descrito está esquematizado de forma simplificada na FIGURA 1.

Os microeletrodos de vidro empregados na medida dos potenciais de membrana achavam-se preenchidos com solução de KCl 3M e apresentavam resistência compreendida entre 5 e 25 M Ω . Para seu preparo foram utilizados tubos de vidros especiais e um "MICRO ELETRODO PULLER" CPF modelo 8104, PALMER. Após ser retirado de seu suporte de estocagem, o microeletrodo era encaixado no tubo de vidro com o filamento de prata cloretado, fixado ao braço do micromanipulador e ligado através de fio condutor ao seguidor catódico. Procedia-se, a seguir, à medida da resistência do microeletrodo (RMe) mergulhando-o na solução nutritiva. Emitia-se, então, um sinal de 100 mV através do circuito registrando-se a deflexão ocorrida no osciloscópio (Vo). A seguir

A

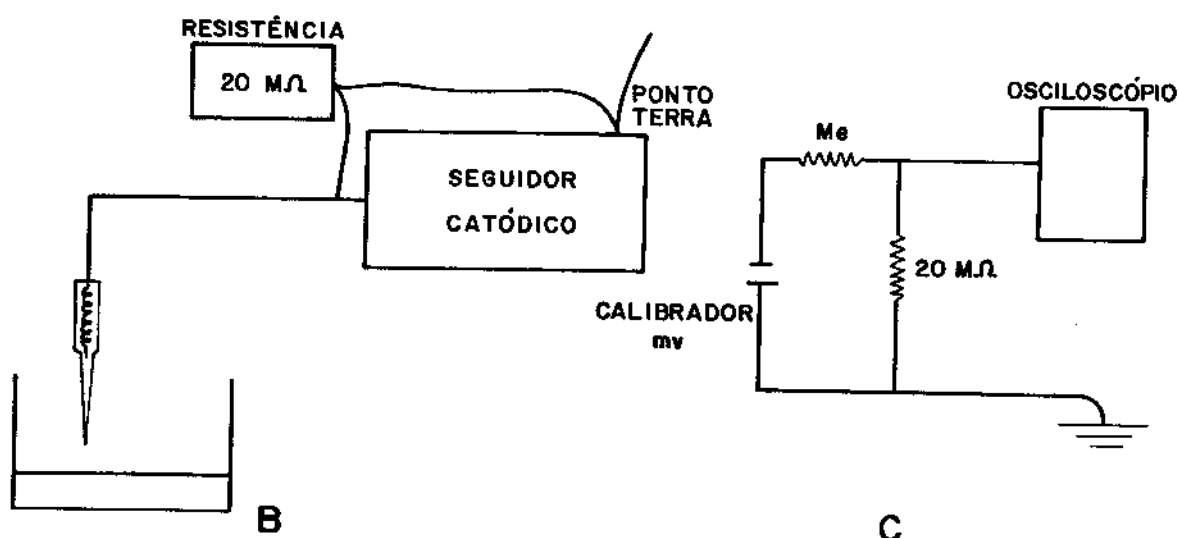
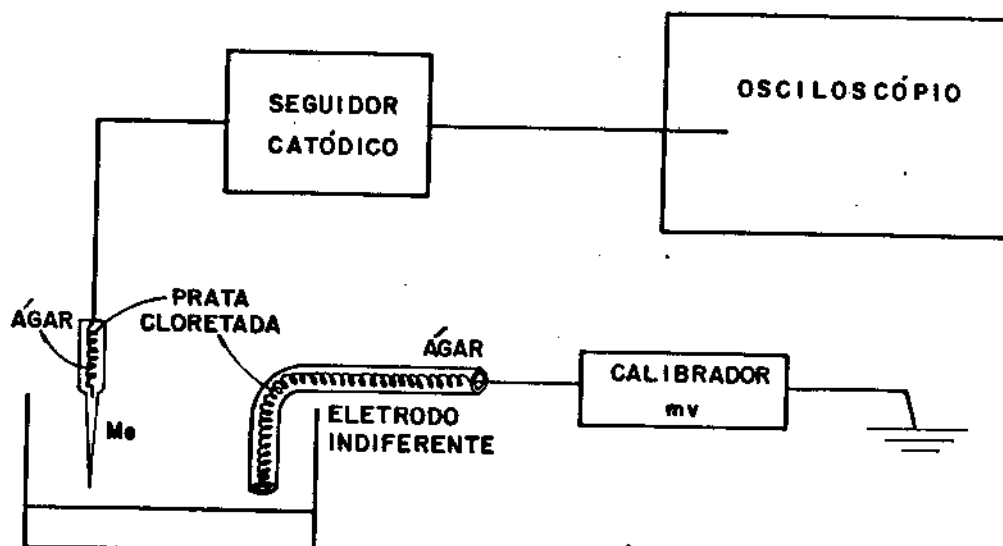


FIGURA - 1

Esquema do circuito para registro eletrofisiológico dos potenciais de membrana

A - Circuito simplificado

B - Circuito simplificado para a obtenção da resistência do Microeletrodo (Me)

C - Circuito para medida da resistência do Microeletrodo

introduzia-se, em paralelo no circuito, resistência com valor conhecido (20 M Ω) e registrava-se a deflexão correspondente no osciloscópio (V). A resistência do microeletrodio era calculada através da fórmula:

$$R_{Me} = \frac{V_o - V}{V} \times 20$$

Desprezavam-se todos aqueles cujas resistências não estivessem compreendidas dentro dos limites pré-estabelecidos.

A determinação do potencial de membrana foi feita da seguinte forma: sob controle microscópico inseria-se o microeletrodio no interior de uma fibra muscular e media-se o deslocamento vertical sofrido pelo feixe luminoso no canal do osciloscópio no momento da penetração. Repetia-se o mesmo procedimento em cinco fibras distintas em período não superior a um minuto. O potencial de membrana, expresso em milivolts (mV) era determinado pela média aritmética dos potenciais obtidos em cinco fibras multiplicados por um fator de correção (F.C.). Este era obtido da relação entre um sinal de 100 mV introduzido no circuito e sua deflexão correspondente no osciloscópio (V_o). Portanto,

$$F.C = \frac{100}{V_o}$$

DESCRIÇÃO DAS EXPERIÊNCIAS

Após permanência da preparação durante trinta minutos no banho, o potencial de membrana era determinado (PM normal). Em seguida, adicionava-se o agonista e o seu efeito sobre o potencial de membrana era acompanhado a intervalos de tempo pré-estabelecidos para cada agonista. Assim, nas experiências

em que se utilizaram o carbacol e decametônio, o registro dos potenciais de membrana era feito a cada quinze minutos até a instalação da dessensibilização, e, naquelas em que se empregaram a succinilcolina e acetilcolina a cada três minutos até a obtenção da despolarização e posteriormente a cada seis minutos até a instalação da dessensibilização. Mediram-se a despolarização e a repolarização na região das placas terminais, até a obtenção de seus valores máximos. Quando havia repolarização máxima na região das placas terminais com estabilização do potencial de membrana (PM controle) a aminopiridina em estudo era adicionada ao banho em concentrações cumulativas (de modo a obter concentração dupla a cada adição) sendo seu efeito acompanhado com a medida do potencial de membrana de quinze em quinze minutos até a obtenção do efeito máximo sobre o potencial de membrana. Naquelas experiências em que se empregou a acetilcolina, o músculo foi pré-tratado por trinta minutos com metilsulfato de neostigmina para impedir sua hidrólise enzimática. Nas experiências em que se aumentou a concentração de cálcio, a isomolaridade da solução nutritiva era mantida reduzindo-se a do sódio.

DROGAS E CONCENTRAÇÕES EMPREGADAS

Usaram-se as seguintes drogas: 3,4-diaminopiridina (ALDRICH CHEMICAL COMPANY, U.S.A.), 4-aminopiridina (SIGMA CHEMICAL COMPANY, U.S.A.), carbacol (KOCHLIGHT LABORATORIES, ENGLAND), brometo de decametônio (SIGMA CHEMICAL COMPANY, U.S.A.), iodeto de acetilcolina (SIGMA CHEMICAL COMPANY, U.S.A.), cloreto de succinilcolina (QUELICIN-ABBOTT LABORATORIES DO BRASIL LTDA.) e metilsulfato de neostigmina (PROSTIGMINE-PRODUTOS ROCHE QUÍMI-

COS E FARMACÊUTICOS S.A.). As soluções ou as diluições foram preparadas no dia da experiência.

Elegeram-se doses das aminopiridinas após estudo piloto e verificação de seus efeitos sobre os potenciais de membrana.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para o estudo das relações logarítmo das concentrações-respostas utilizou-se o $\log_q \frac{d_i}{d_0}$, sendo q = a razão geométrica da dosagem (nosso caso, $q = 2$), d_i = a concentração i -ésima, d_0 = a primeira concentração. Desse modo, qualquer dosagem feita em progressão geométrica, independente de seus valores passa a ter forma, $X = 0, 1, 2 \dots n$ (PIEDRABUENA).

Em todas as experiências a obtenção das curvas logarítmo das concentrações-respostas foi feita utilizando-se os valores médios dos potenciais de membrana em percentagem do efeito máximo controle. Estes foram transformados em "probits" para determinar a similaridade do efeito (paralelismo) e a potência relativa expressa pela simples relação entre as DE_{50} . Fizeram-se as curvas sigmóides que figuram nas representações gráficas com os valores das retas probíticas postos novamente em percentagem.

Para se verificar a similaridade de efeito entre a 3,4-diaminopiridina e 4-aminopiridina e a relação de atividade entre as duas, determinou-se também o título (potência) pelo método da dosagem biológica quantitativa a 8 pontos, testando as diferentes causas de variação com a análise de variância pelos polinômios ortogonais.

Nas experiências em presença de diferentes concentrações de cálcio, com os valores médios dos potenciais de membrana determinou-se também os parâmetros da regressão linear para confirmar o paralelismo e o afastamento entre as retas, o que se fez pelo teste de STUDENT.

Nos casos em que houve necessidade de se comparar os valores médios de apenas duas variáveis, tal comparação foi realizada através do teste de STUDENT.

O nível de significância adotado para as tomadas de decisões foi de 5%.

IV - R E S U L T A D O S

IV - RESULTADOS

Efeito da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal provocada pelo carbacol. Comparação de sua atividade com a 4-aminopiridina.

A adição de carbacol na concentração de 800 μ M produziu despolarização da região das placas terminais, a qual atingiu seu máximo aos $33 \pm 8,74$ minutos após sua adição ao banho, tendo os potenciais de membrana alcançado valores máximos, em média, de $63,26 \pm 2,86$ mV (TABELA I). Após este período de despolarização sobreveio repolarização desta região apesar da presença do carbacol no banho, a qual atingiu seu valor máximo aos $99 \pm 16,83$ minutos e os potenciais de membrana medidos no momento da repolarização máxima apresentaram valores médios de $81,44 \pm 2,64$ mV (TABELA I). Quando da estabilização do potencial de membrana, a adição de 3,4-diaminopiridina propiciou nova fase de despolarização. Os valores médios dos potenciais de membrana medidos 15 minutos após cada adição cumulativa da 3,4-diaminopiridina foram respectivamente, em mV: $74,40 \pm 2,96$; $71,86 \pm 2,47$; $67,60 \pm 2,09$; $64,12 \pm 1,72$; $60,54 \pm 2,24$; $59,16 \pm 2,54$ (TABELA II, FIGURA 2). O efeito da 3,4-diaminopiridina mostrou-se pois, concentração-dependente. A despolarização produzida pelo carbacol após a adição da maior concentração de 3,4-diaminopiridina foi superior àquela produzida antes da ocorrência do fenômeno da dessensibilização (TABELA II).

A curva logarítmo da concentração-resposta média da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização provocada pelo

TABELA I - EFEITO DA ADIÇÃO DE CARBACOL-CCh (800 μ M) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NA REGIÃO DAS PLACAS TERMINAIS DO DIAFRAGMA ISO LADO DE RATO.

Exp. n°	PM antes adição CCh (mV)	Despolarização má- xima após CCh		Repolarização máxima após CCh (Dessensibilização)	
		PM (mV)	t (min)	PM (mV)	t (min)
01	85,0	66,3	30	86,3	75
02	91,7	70,8	60	82,1	90
03	80,0	58,4	15	84,2	90
04	85,0	65,8	15	83,4	165
05	85,0	55,0	45	71,2	75
MÉDIA	85,34	63,26	33	81,44	99
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
ERRO PADRÃO	1,86	2,86	8,74	2,64	16,83

PM = Potencial de membrana (média de cinco fibras)

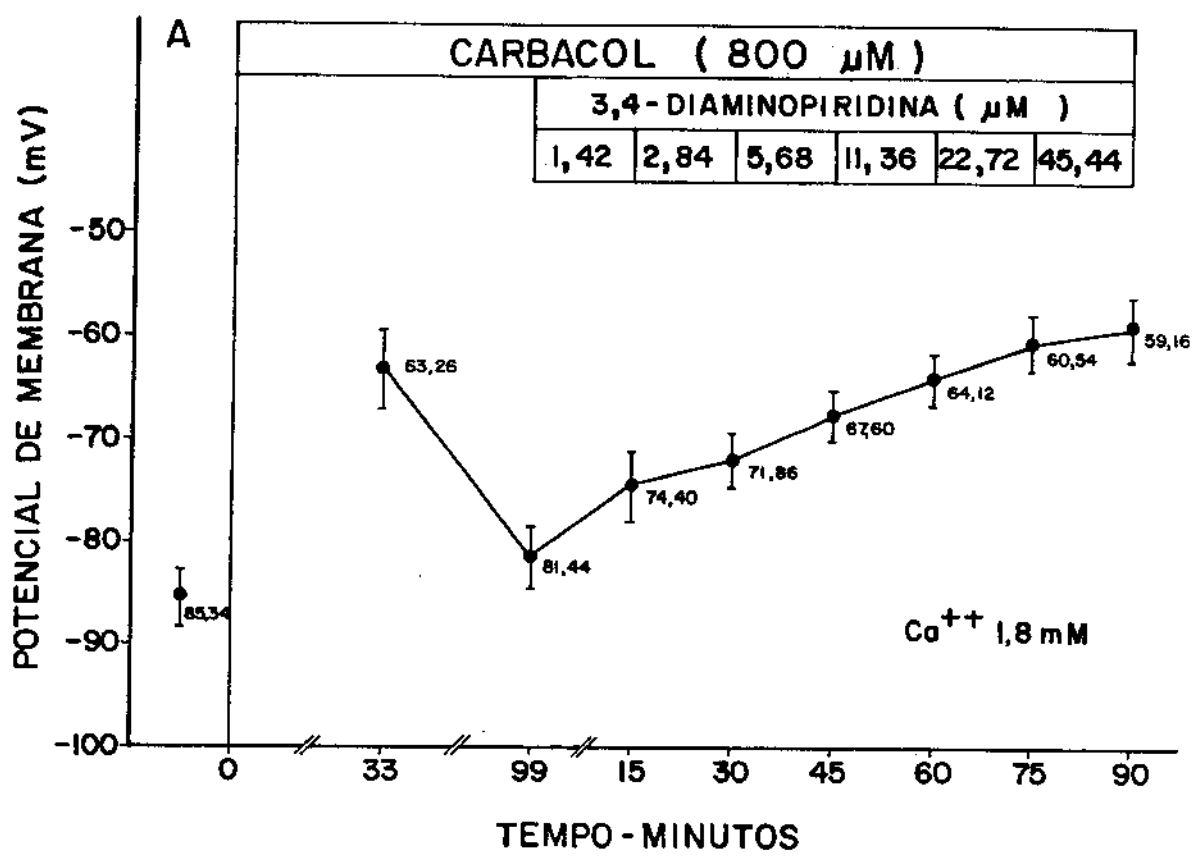


FIGURA - 2

- Efeito antagônico da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal produzida pelo carbacol (800 μ M), no diafragma isolado de rato.
 - Cada ponto representa a média dos potenciais de membrana de cinco experiências.
 - As barras verticais representam o erro padrão da média.
- A - potencial de membrana antes da adição de carbacol ao banho.

carbacol, em 5 experiências, apresentou forma sigmóide (FIGURA 3). A sua DE_{50} determinada pelo método dos "probits" foi de $3,35 \mu M$ (FIGURA 3).

Os resultados com o uso da 4-aminopiridina encontram-se na TABELA III e FIGURAS 4 e 5. A sua DE_{50} foi de $17,34 \mu M$ (FIGURA 5). Portanto a atividade da 3,4-diaminopiridina determinada pela simples relação entre as concentrações medianas efetivas foi 5 vezes aproximadamente maior que a da 4-aminopiridina. A relação da atividade da 3,4-diaminopiridina e 4-aminopiridina pelo método da dosagem biológica quantitativa a 8 pontos foi de 0,22 com um intervalo da confiança de 0,26 a 0,19, ou seja, a 3,4-diaminopiridina mostrou-se por este método 4,48 vezes mais potente que a 4-aminopiridina, com um intervalo de confiança de 3,83 a 5,25 vezes. As curvas logaritmo das concentrações-respostas da 3,4-diaminopiridina e 4-aminopiridina em percentagem do efeito máximo controle e ajustada pelo método dos "probits" mostraram-se paralelas (FIGURA 6). Os resultados da análise de variância obtida pelos polinômios ortogonais, comparando os efeitos da 3,4-diaminopiridina e 4-aminopiridina sobre a dessensibilização do receptor da placa terminal provocada pelo carbacol podem ser observados na TABELA IV.

Efeito da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal provocada pelo decametônio, succinilcolina e acetilcolina em presença de neostigmina

A adição de decametônio na concentração de $478,05 \mu M$ produziu despolarização da região das placas terminais, a qual atingiu seu máximo em média aos $45 \pm 8,21$ minutos após sua

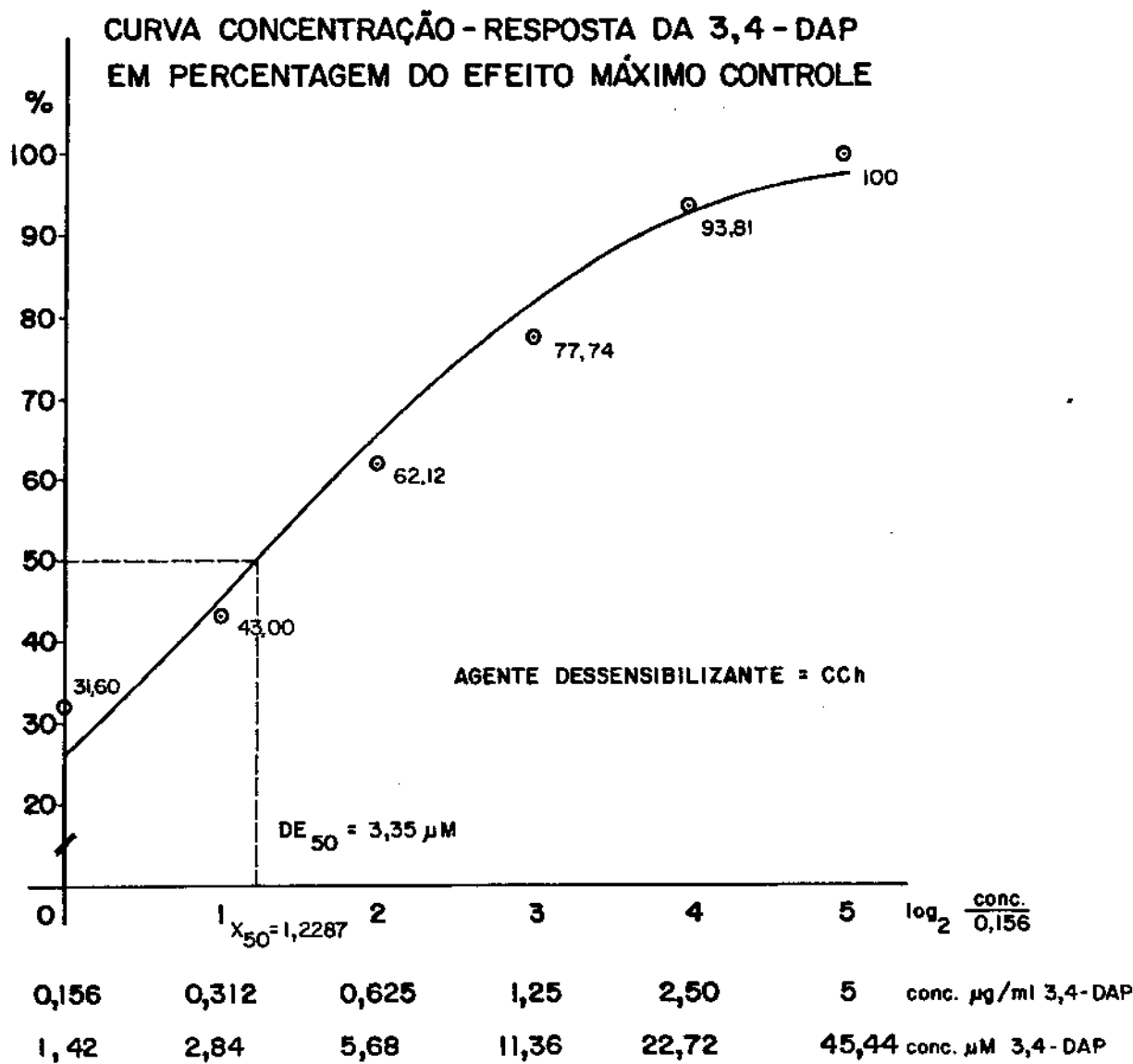


FIGURA - 3

- Curva cumulativa logaritmo da concentração-resposta da 3,4-dia minopiridina (3,4-DAP), ajustada pelo método dos "probits". Dia fragma isolado de rato dessensibilizado pelo carbacol-CCh (800 μM).
- Cada ponto representa os valores percentuais das médias dos po tenciais de membrana obtidos com cada concentração cumulativa de 3,4-DAP em percentagem do efeito máximo contrôlo-grau de dessensibilização (cinco experiências).
- DE_{50} determinada pelo método dos "probits".

TABELA III- EFEITO DA 4-AMINOPIRIDINA (4-AP) NA DESSENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR DA PLACA TERMINAL PRODUZIDA PELO CARBACOL (CCh) NO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

PM		PM		CCh		(800 μ M) - mV.			
Exp. n°	antes	ANTES 4-AMINOPIRIDINA		APÓS		4-AMINOPIRIDINA		CCh ₁	
	CCh (mV)	Despolarização máxima		Repolarização máxi- ma(Desensibilização)		CONCENTRAÇÃO		(μ M)	
01	87,3	63,4	75,6	72,0	70,4	66,9	59,9	58,2	57,8
02	88,0	68,0	85,0	76,9	73,5	69,3	67,0	65,0	63,3
03	90,4	65,0	78,3	72,6	69,6	65,8	61,7	57,8	57,5
04	81,6	64,3	73,8	67,3	66,0	65,8	64,3	57,8	55,6
05	87,7	66,8	80,8	77,0	73,6	70,6	64,7	64,2	62,1
MÉDIA	87,00	65,50	78,70	73,16	70,62	67,68	63,52	60,60	59,26
ERRO	±	±	±	±	±	±	±	±	±
PADRÃO	1,45	0,83	1,97	1,79	1,40	0,97	1,23	1,64	1,46
									0,02

-PM= Potencial de Membrana (média de cinco fibras)

- As concentrações de 4-AP foram aplicadas cumulativamente, cada concentração foi adicionada ao banho 15 minutos após a adição da anterior

-CCh₁= Despolarização máxima produzida pelo carbacol antes da adição de 4-AP ao banho

-CCh₂= Despolarização máxima produzida pelo carbacol após a adição de 4-AP ao banho

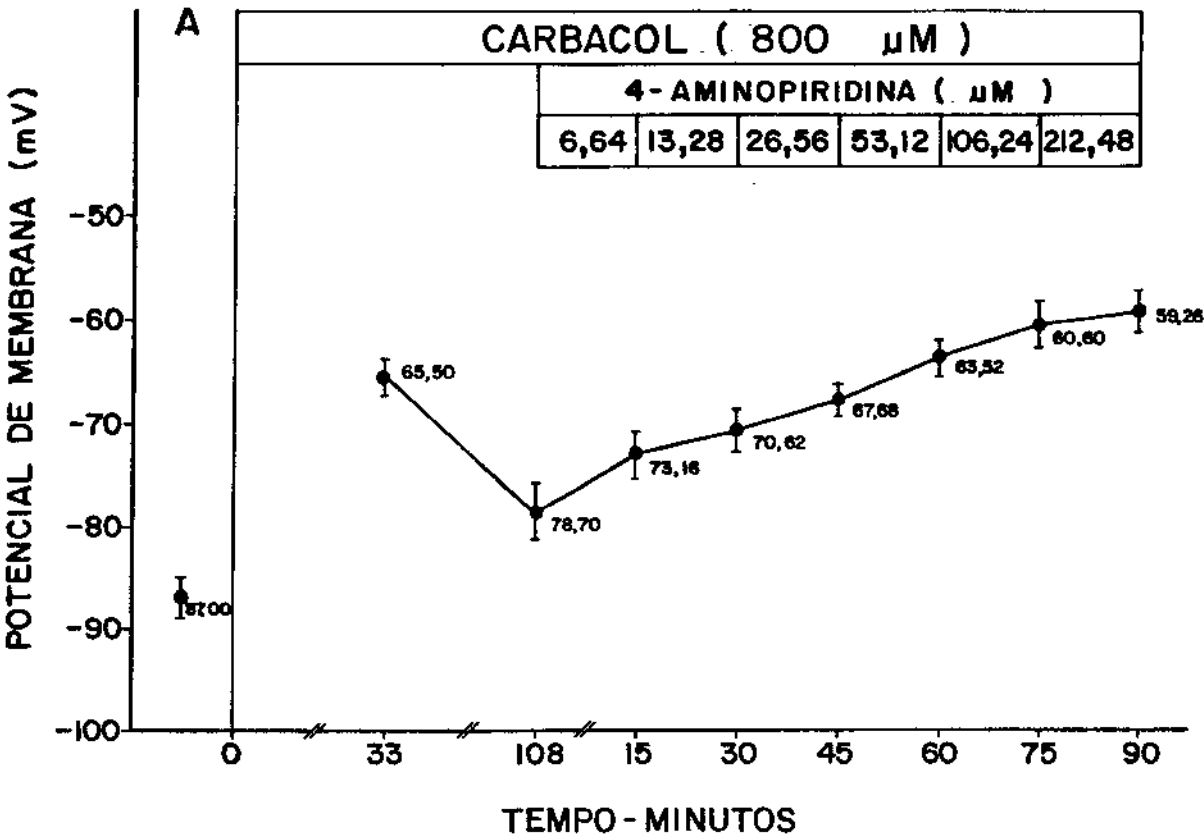


FIGURA - 4

- Efeito antagônico da 4-aminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal produzida pelo carbacol (800 μ M), no diafragma isolado de rato.
 - Cada ponto representa a média dos potenciais de membrana de cinco experiências.
 - As barras verticais representam o erro padrão da média.
- A - potencial de membrana antes da adição de carbacol ao banho.

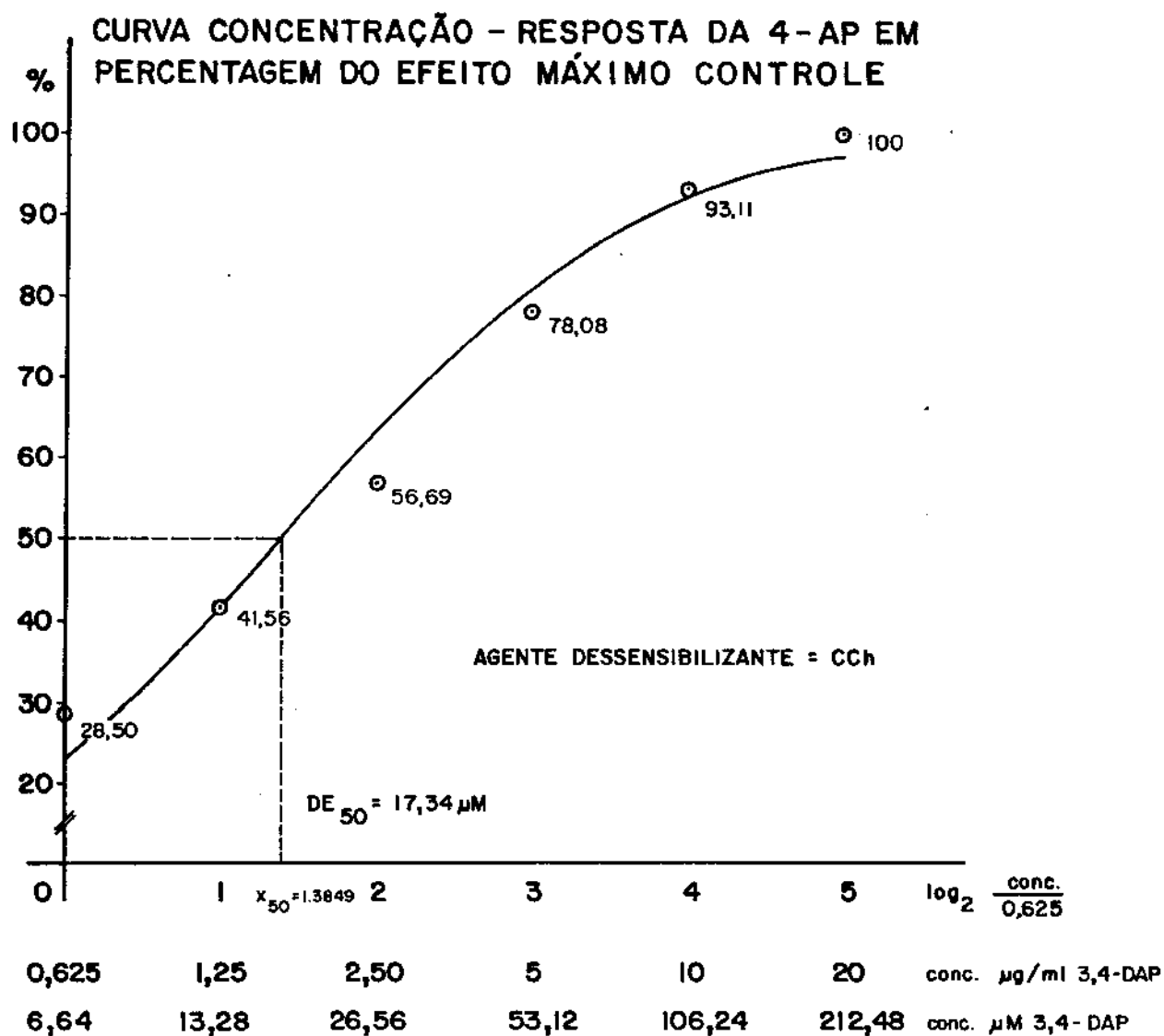


FIGURA - 5

- Curva cumulativa logaritmo da concentração-resposta da 4-aminopiridina (4-AP), ajustada pelo método dos "probits". Diafragma isolado de rato, dessensibilizado pelo carbacol - CCh (800 μM).
- Cada ponto representa os valores percentuais das médias dos potenciais de membrana obtidos com cada concentração cumulativa de 4-AP em percentagem do efeito máximo controle-grau de dessensibilização (cinco experiências)
- DE_{50} determinada pelo método dos "probits".

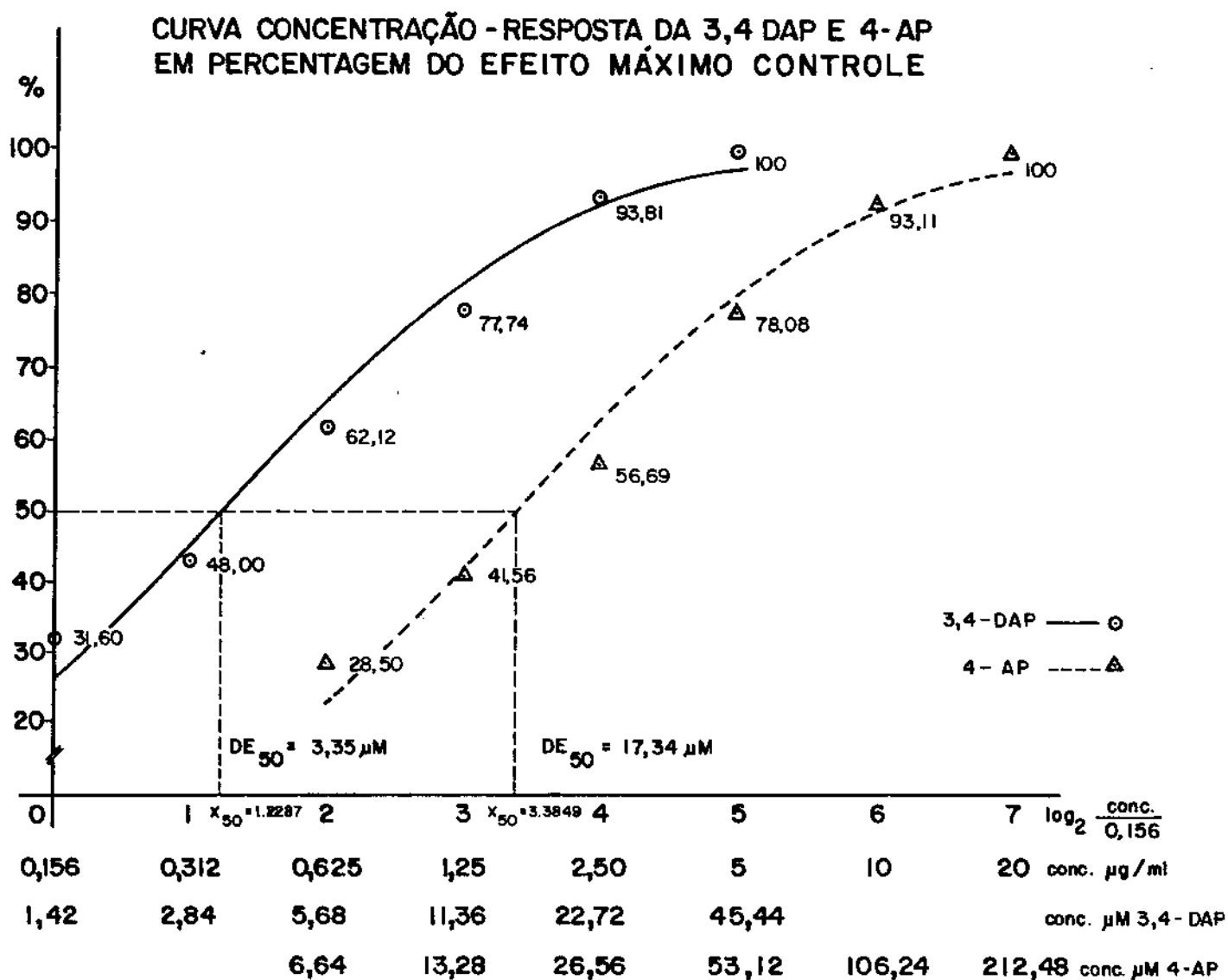


FIGURA - 6

- Curva cumulativa logaritmo da concentração-resposta comparativa entre 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) e 4-aminopiridina (4-AP), ajustadas pelo método dos probits. Diafragma isolado de rato dessensibilizado pelo carbacol (800 μ M).
- Cada ponto representa os valores percentuais das médias dos potenciais de membrana obtidos com cada concentração cumulativa da 3,4-DAP e 4-AP em percentagem do efeito máximo controle-grau de dessensibilização (cinco experiências).
- DE_{50} determinadas pelo método dos "probits".

TABELA IV - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS DOS EFEITOS DA 3,4-MINOPIRIDINA (3,4-DAP) e 4-AMINOPIRIDINA (4-AP) SOBRE A SENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR DA PLACA TERMINAL PRODUZIDO CARBACOL NO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
DROGAS	1	346,9210	346,9210	20,901 *
REGRESSÃO 1º GRAU	1	461,4722	461,4722	27,802 *
PARALELISMO 1º GRAU	1	1,0952	1,0952	0,066 NS
REGRESSÃO 2º GRAU	1	0,1440	0,1440	0,009 NS
PARALELISMO 2º GRAU	1	8,6490	8,6490	0,521 NS
REGRESSÃO 3º GRAU	1	0,2738	0,2738	0,016 NS
PARALELISMO 3º GRAU	1	1,2168	1,2168	0,073 NS
CONCENTRAÇÃO	7	819,7720	117,1103	7,056 *
RESÍDUO	32	531,1480	16,5984	—
TOTAL	39	1350,9200	—	

NS = Diferença não significativa

* = Diferença significativa ao nível de 5%

adição ao banho, tendo os potenciais de membrana alcançado valores médios máximos de $74,28 \pm 2,16$ mV (TABELA V). Após este período de despolarização sobreveio repolarização desta região a despeito da presença de decametônio ao banho, a qual atingiu seu valor máximo aos $102 \pm 5,61$ minutos e os potenciais de membrana medidos no momento da repolarização máxima apresentaram valores médios de $83,14 \pm 2,25$ mV (TABELA V). Quando da estabilização do potencial de membrana a adição de 3,4-diaminopiridina propiciou nova fase de despolarização. Os valores médios dos potenciais de membrana medidos 15 minutos após cada adição cumulativa de 3,4 - diaminopiridina foram respectivamente, em mV: $74,24 \pm 1,79$; $72,64 \pm 2,17$; $69,84 \pm 2,15$; $67,34 \pm 1,94$; $63,42 \pm 2,52$; $60,72 \pm 1,22$ (TABELA VI, FIGURA 7). A despolarização produzida pelo decametônio após a adição da maior concentração de 3,4-diaminopiridina foi superior àquela produzida antes da ocorrência do fenômeno da dessensibilização (TABELA VI).

A curva logarítmo da concentração-resposta média da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização provocada pelo decametônio, em 5 experiências, apresentou forma sigmóide (FIGURA 8). A DE_{50} da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor colinérgico provocada pelo decametônio determinada pelo método dos "probits" foi de $2,80 \mu\text{M}$ (FIGURA 8).

A adição de succinilcolina na concentração de $110,71 \mu\text{M}$ produziu despolarização máxima em média, das placas terminais aos $5,4 \pm 1,12$ minutos após sua adição ao banho, tendo, os potenciais de membrana alcançado valores máximos em média de $73,54 \pm 2,67$ mV (TABELA VII). Após este período de despolarização sobreveio repolarização desta região a despeito da presença da suc

TABELA V - EFEITO DA ADIÇÃO DE DECAMETÔNIO - C_{10} ($478,05 \mu M$) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NA REGIÃO DAS PLACAS TERMINAIS DO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

Exp. n°	PM antes adição C_{10} (mV)	Despolarização má xima após C_{10}		Repolarização máxima após C_{10} (Dessensibilização)	
		PM (mV)	t (min)	PM (mV)	t (min)
01	88,8	71,7	60	75,8	120
02	86,7	75,0	45	85,4	90
03	87,5	67,9	45	80,4	105
04	92,0	76,0	15	85,6	90
05	92,0	80,8	60	88,5	105
MÉDIA	89,40	74,28	45	83,14	102
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
ERRO PADRÃO	1,11	2,16	8,21	2,25	5,61

PM = Potencial de membrana (média de cinco fibras)

TABELA VI- EFEITO DA 3, 4-DIAMINOPIRIDINA (3, 4-DAP) NA DESENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR DA PLACA TERMINAL PRODUZIDA PELO DECAMETÔNIO (C_{10}) NO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

Exp. nº	PM antes C ₁₀ (mV)	PM		C ₁₀	(478,05 µM)-mV				C ₁₀ (1) ----- C ₁₀ (2)
		ANTES 3,4- DIAMINOPIRIDINA Despolarização máxima	ANTES Repolarização máxi- ma (Dessensibilização)		APÓS				
					CONCENTRAÇÃO	3,4- DAP	(µM)		
				1,42	2,84	5,68	11,36	22,72	45,44
01	88,8	71,7	75,8	70,8	69,2	65,0	64,6	60,8	1,18
02	86,7	75,0	85,4	76,7	74,2	73,0	65,4	62,8	1,21
03	87,5	67,9	80,4	69,0	66,0	65,0	63,4	57,3	1,18
04	92,0	76,0	85,6	77,3	76,7	75,8	74,1	72,5	1,18
05	92,0	80,8	88,5	77,4	77,1	70,4	69,2	63,7	1,36
MÉDIA + - ERRO PADRÃO	89,40 + - 1,11	74,28 + - 2,16	83,14 + - 2,25	74,24 + - 1,79	72,64 + - 2,17	69,84 + - 2,15	67,34 + - 1,94	63,42 + - 2,52	1,22 + - 0,03

-PM = Potencial de Membrana (média de cinco fibras)

-As concentrações de 3,4-DAP foram aplicadas cumulativamente, cada concentração foi adicionada ao banho 15 minutos após a adição da anterior

$-C_{10(1)}$ = Despolarização máxima produzida pelo decametônio (C_{10}) antes da adição de 3,4-DAP ao banho

$-C_{10}(2)$ = Despolarização máxima produzida pelo decametônio (C_{10}) após a adição de 3,4-DAP ao banho

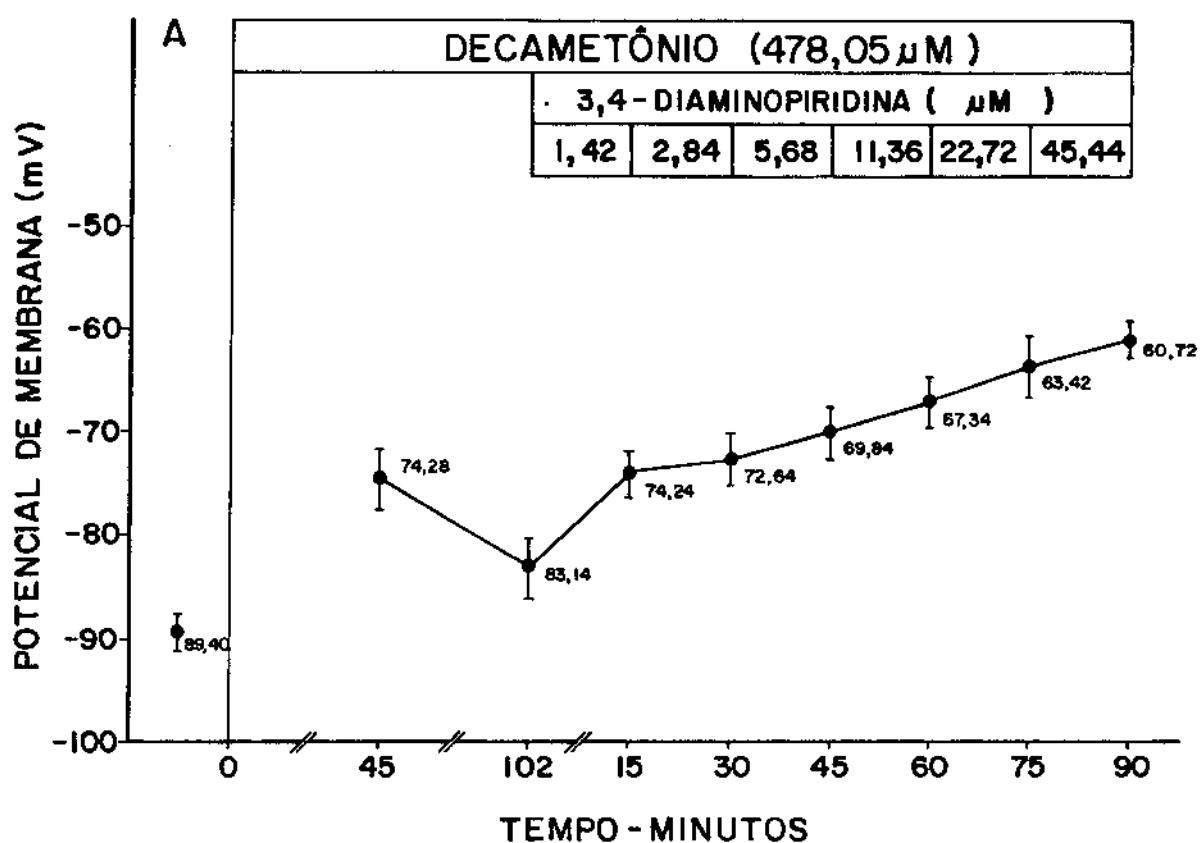


FIGURA - 7

- Efeito antagônico da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal produzida pelo decametônio (478,05 μ M), no diafragma isolado de rato.
 - Cada ponto representa a média dos potenciais da membrana de cinco experiências.
 - As barras verticais representam o erro padrão da média.
- A- potencial da membrana antes da adição de decametônio ao banho

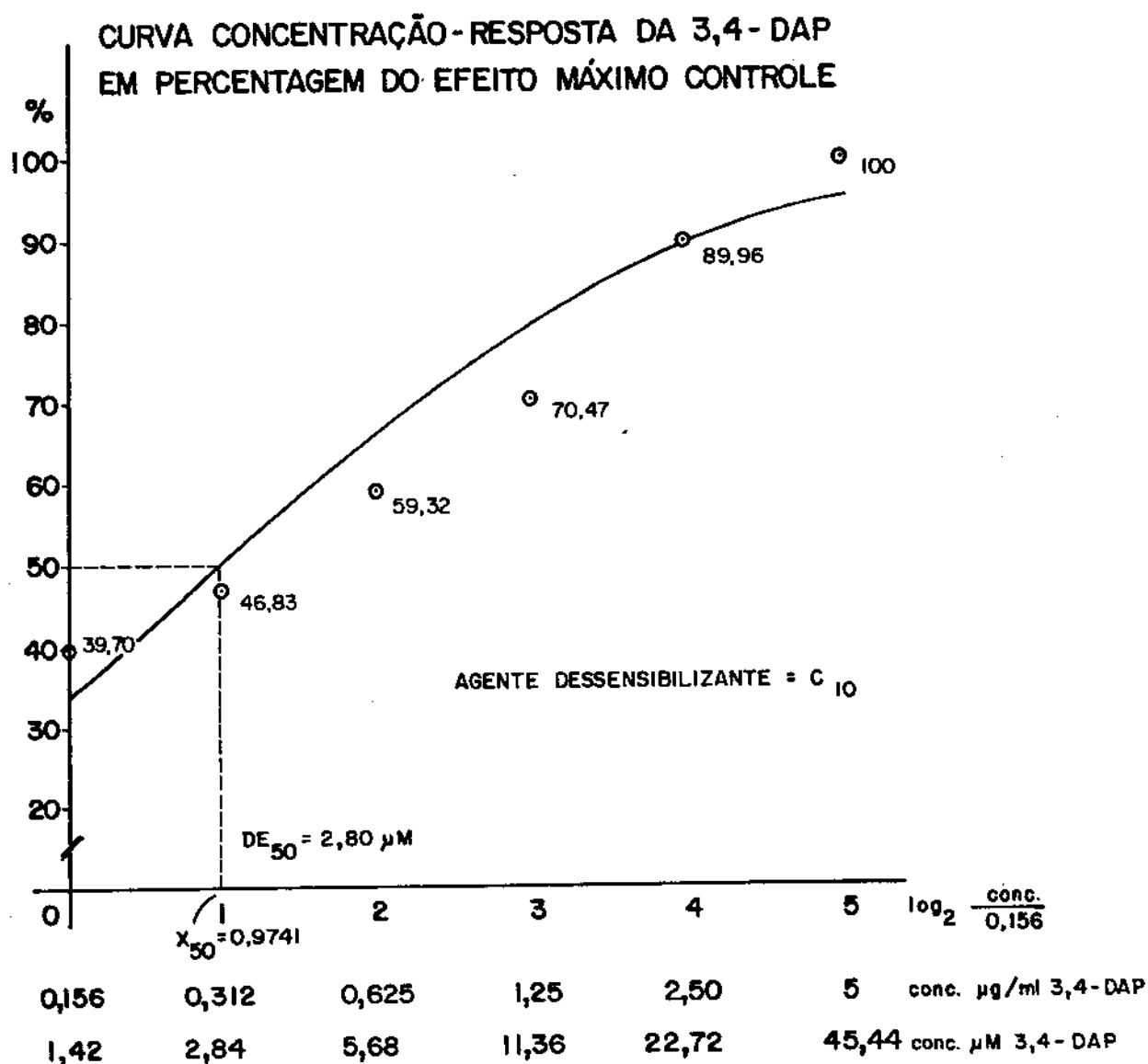


FIGURA - 8

- Curva cumulativa logaritmo da concentração-resposta da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP), ajustada pelo método dos "probits". Diafragma isolado de rato dessensibilizado pelo decame_tônio-C₁₀ (478,05 μM).
- Cada ponto representa os valores percentuais das médias dos potenciais de membrana obtidos com cada concentração cumulativa de 3,4-DAP em percentagem do efeito máximo controle - grau de dessensibilização (cinco experiências).
- DE₅₀ determinada pelo método dos "probits".

TABELA VII - EFEITO DA ADIÇÃO DE SUCCINILCOLINA - Sch ($110,71 \mu\text{M}$) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NA REGIÃO DAS PLACAS TERMINAIS DO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

Exp.nº	PM antes adição Sch (mV)	Despolarização máxima após Sch		Repolarização máxima após Sch (Dessensibilização)	
		PM(mV)	t(min)	PM (mV)	t (min)
01	86,3	66,7	9	86,3	30
02	94,3	72,5	6	88,6	21
03	88,0	74,6	3	80,3	15
04	89,4	71,0	3	84,3	15
05	92,5	82,9	6	92,9	27
MÉDIA	90,10	73,54	5,4	86,48	26,4
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
ERRO PADRÃO	1,46	2,67	1,12	2,10	4,06

PM = Potencial de membrana (média de cinco fibras)

cinilcolina no banho, a qual atingiu seu valor máximo em média aos $26,4 \pm 4,06$ minutos e os potenciais de membrana medidos no momento da repolarização máxima apresentaram valores médios de $86,48 \pm 2,10$ mV (TABELA VII). Quando da estabilização do potencial de membrana a adição da 3,4-diaminopiridina propiciou nova fase de despolarização. Os valores médios dos potenciais de membrana medidos 15 minutos após cada adição cumulativa de 3,4-diaminopiridina foram respectivamente, em mV: $79,38 \pm 1,75$; $77,32 \pm 2,32$; $75,78 \pm 2,67$; $73,30 \pm 2,05$; $65,38 \pm 1,87$; $60,10 \pm 2,22$ (TABELA VIII, FIGURA 9). A despolarização produzida pela succinilcolina após a adição da maior concentração de 3,4-diaminopiridina foi superior àquela produzida antes da ocorrência do fenômeno da dessensibilização (TABELA VIII).

A curva logaritmo da concentração-resposta da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização provocada pela succinilcolina, em 5 experiências, apresentou forma sigmóide (FIGURA 10). A DE_{50} da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal provocada pela succinilcolina, determinada pelo método dos "probits" foi de $6,08 \mu\text{M}$ (FIGURA 10).

A adição de acetilcolina na concentração de $219,69 \mu\text{M}$ na presença de $2,24 \mu\text{M}$ de neostigmina produziu despolarização da região das placas terminais, a qual atingiu seu máximo, em média aos $8,4 \pm 0,60$ minutos após sua adição ao banho, tendo os potenciais de membrana alcançado valores máximos em média de $73,50 \pm 2,00$ mV (TABELA IX). Após este período de despolarização sobreveio repolarização desta região a despeito da presença de acetilcolina no banho, a qual atingiu seu valor máximo, em média aos $30 \pm 4,74$ minutos e os potenciais de membrana medidos no momen

TABELA VIII - EFEITO DA 3,4-DIAMINOPIRIDINA (3,4-DAP) NA DESSENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR DA PLACA TERMINAL PRODUZIDA PELA SUCCINILCOLINA (Sch) NO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

Exp. nº	PM antes Sch (mV)	PM		APÓS	SCH	(110,71 μ M)		APÓS		3,4- CONCENTRAÇÃO	3,4- DIAMINOPIRIDINA (μ M)	Sch	
		ANTES 3,4-DIAMINOPIRIDINA Despolarização máxima	Repolarização máxi- ma (Dessensibilização)			3,4- DIAMINOPIRIDINA	3,4- DIAMINOPIRIDINA	Sch ₁	Sch ₂				
				1,42		2,84	5,68	11,36	22,72		45,44		
01	86,3	66,7	86,3	79,6		77,5	77,1	73,0	70,4		66,7		1,00
02	94,3	72,5	88,6	80,0		79,0	78,6	77,7	60,4		56,7		1,28
03	88,0	74,6	80,3	76,8		73,0	67,8	67,8	67,3		59,5		1,25
04	89,4	71,0	84,3	75,1		72,1	72,1	69,9	61,7		54,3		1,31
05	92,5	82,9	92,9	85,4		85,0	83,3	78,1	67,1		63,3		1,31
MÉDIA + -	90,10	73,54	86,48	79,38		77,32	75,78	73,30	65,38		60,10		1,23
ERRO	+ -	+ -	+ -	+ -		+ -	+ -	+ -	+ -		+ -		+ -
PADRÃO	1,46	2,67	2,10	1,75		2,32	2,67	2,05	1,87		2,22		0,06

-PM = Potencial de Membrana (média de cinco fibras)

-As concentrações de 3,4-DAP foram aplicadas cumulativamente, cada concentração foi adicionada ao banho 15 minutos após a adição da anterior

-Sch₁=Despolarização máxima produzida pela SCH antes da adição de 3,4-DAP ao banho

com -n-ncn1arivazão máxima produzida pela Sch após a adição de 3,4-DAP ao banho

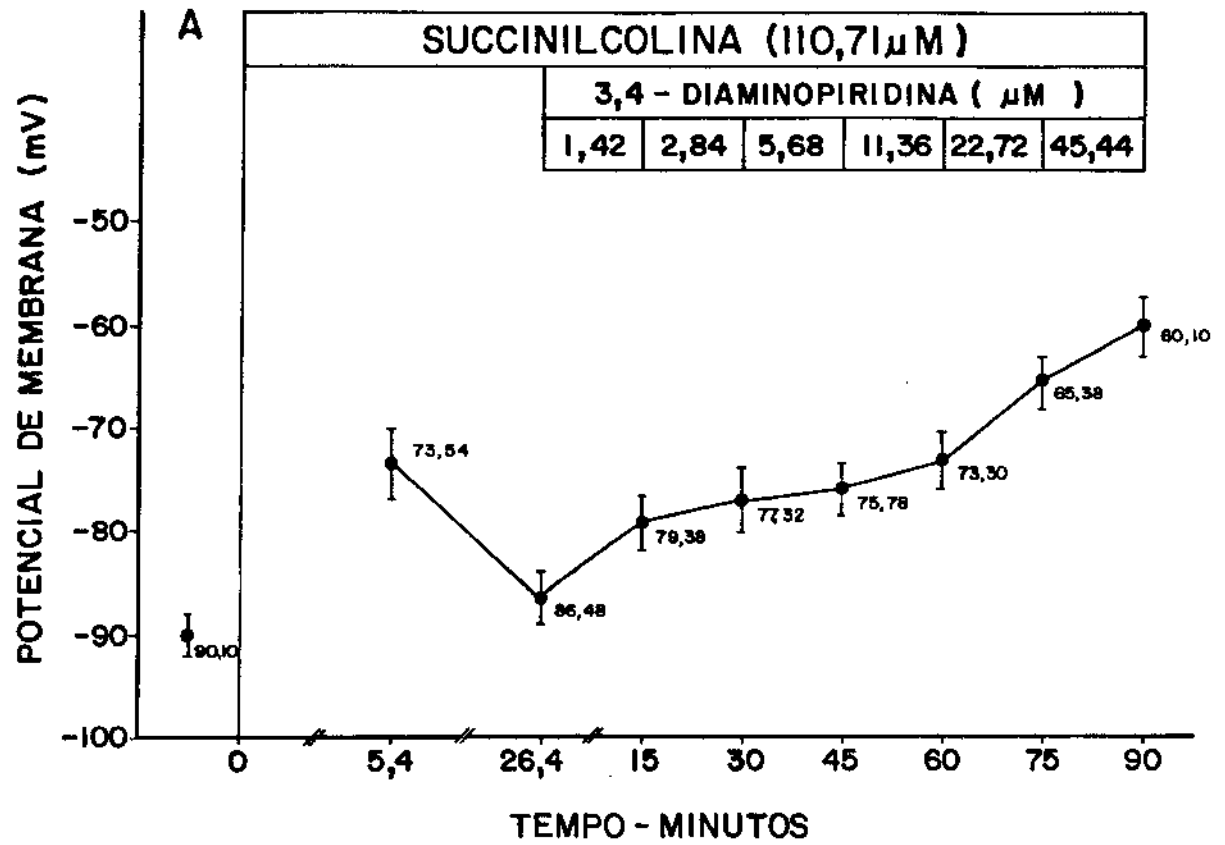


FIGURA - 9

- Efeito antagônico da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) na dessensibilização do receptor da placa terminal produzida pela succinilcolina (110,71 μ M), no diafragma isolado de rato.
- Cada ponto representa a média dos potenciais de membrana de cinco experiências.
- As barras verticais representam o erro padrão da média.

A - potencial de membrana antes da adição de succinilcolina ao banho.

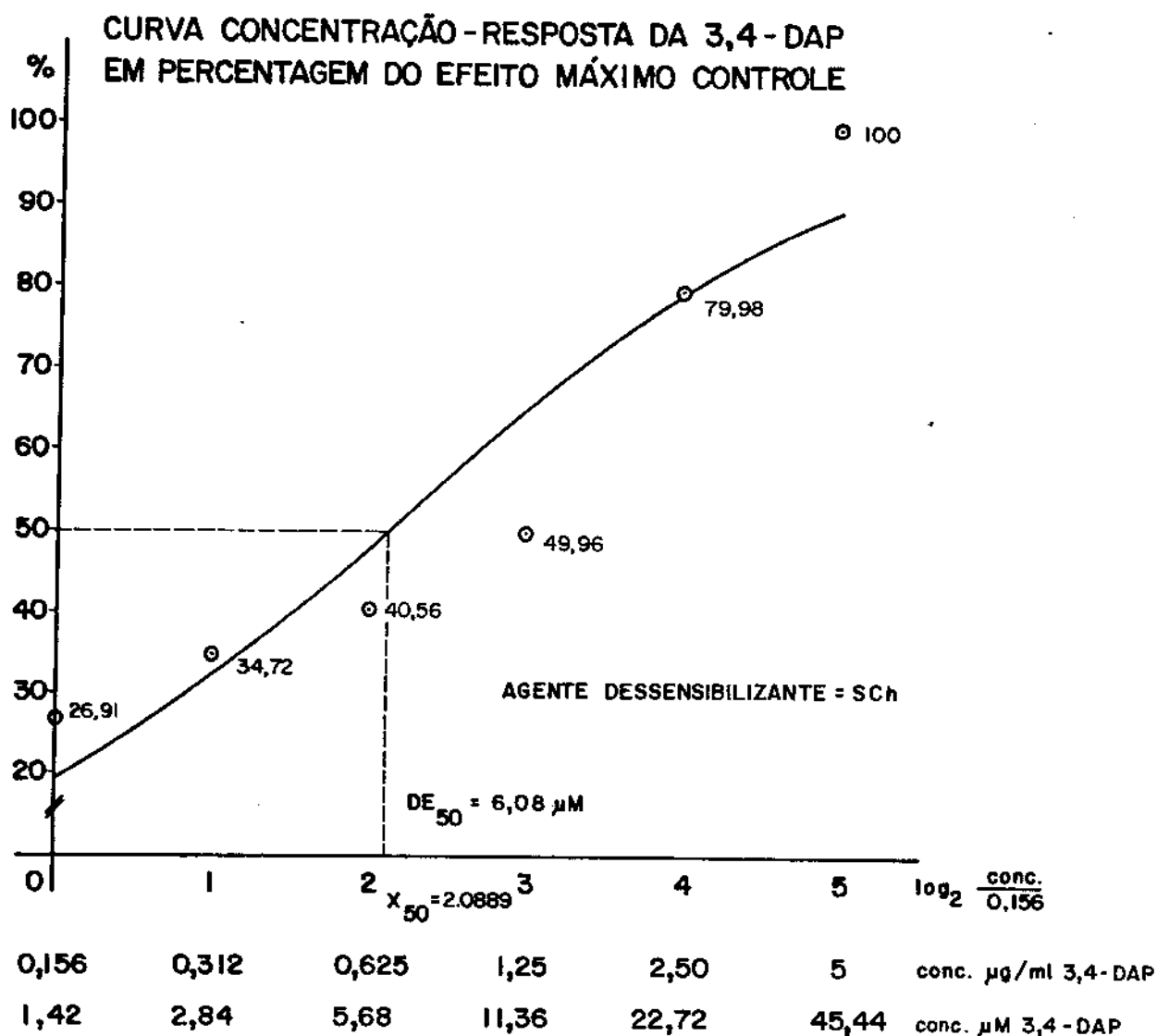


FIGURA - 10

- Curva cumulativa logaritmo da concentração-resposta da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) ajustada pelo método dos "probits". Diafragma isolado de rato dessensibilizado pela succinilcolina-SCh ($110,71 \mu M$).
- Cada ponto representa os valores percentuais das médias dos potenciais de membrana obtidos com cada concentração cumulativa da 3,4-DAP em percentagem do efeito máximo controle-grau de dessensibilização (cinco experiências).
- DE_{50} determinada pelo método dos "probits".

TABELA IX- EFEITO DA ADIÇÃO DE ACETILCOLINA - ACh (219,69 μ M) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NA REGIÃO DAS PLACAS TERMINAIS DO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

Exp. n°	PM antes adição ACh (mV)	Despolarização máxima após ACh		Repolarização máxima após ACh (Dessensibilização)	
		PM (mV)	t (min)	PM (mV)	t (min)
01	92,0	76,6	9	85,5	45
02	92,3	72,3	9	85,5	30
03	89,4	74,9	9	83,4	30
04	91,0	77,4	6	83,4	15
05	91,9	66,3	9	85,9	30
MÉDIA	91,32	73,50	8,4	84,74	30
$\pm$ ERRO	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
PADRÃO	0,52	2,00	0,60	0,55	4,74

PM = Potencial de Membrana (média de cinco fibras)

to da repolarização máxima apresentarem valores médios de $84,74 \pm 0,55$ mV (TABELA IX). Quando da estabilização do potencial de membrana a adição de 3,4-diaminopiridina propiciou nova fase de despolarização. Os valores médios dos potenciais de membrana medidos 15 minutos após cada adição cumulativa de 3,4-diaminopiridina foram respectivamente, em mV: $79,80 \pm 0,33$; $77,58 \pm 0,28$; $74,94 \pm 0,79$; $72,70 \pm 1,19$; $70,22 \pm 0,88$; $68,86 \pm 1,26$ (TABELA X, FIGURA 11). A despolarização produzida pela acetilcolina após a adição da maior concentração de 3,4-diaminopiridina foi superior àquela produzida antes da ocorrência do fenômeno da dessensibilização (TABELA X).

A curva logarítmo da concentração- resposta da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização provocada pela acetilcolina, em 5 experiências, apresentou forma sigmóide (FIGURA 12). A DE_{50} da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor colinérgico provocada pela acetilcolina e determinada pelo método dos "probits" foi de $3,35 \mu\text{M}$ (FIGURA 12).

Os resultados do efeito da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal provocado pelos agonistas carbacol, decametônio, succinilcolina e acetilcolina encontram-se agrupadas na TABELA XI e as curvas logarítmo das concentrações-respostas da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização provocada pelos mesmos, na FIGURA 13. A análise pelo método dos "probits" mostrou não haver diferença significativa nos desvios do paralelismo das curvas logarítmo das concentrações-respostas da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal provocada pelo carbacol, decametônio, succinilcolina e acetilcolina. Também não foi significativa a diferença entre os afastamentos das mesmas (FIGURA 13).

TABELA X - EFEITO DA 3,4-DIAMINOPIRIDINA (3,4-DAP) NA DESSENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR DA PLACA TERMINAL PRODUZIDA PELA ACETILCOLINA (ACh) NO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

Exp. nº	PM ANTES ACh (mV)		PM	APÓS	ACh	(219,69 µM)				ACh ₁		
	ANTES	APÓS				3,4- DIAMINOPIRIDINA						
						ANTES	3,4-DIAMINOPIRIDINA	APÓS	C O N C E N T R A Ç Ã O 3,4- DAP (µM)			
											Despolarização máxima	Repolarização max. (Dessensibilização)
	Neostigmina (2,24 µM)										ACh ₂	
						1,42	2,84	5,68	11,36	22,72	45,44	
01	94,5	92,0	76,6	85,5	77,4	79,2	77,4	73,2	69,0	68,5	66,4	1,15
02	96,6	92,3	72,3	85,5	76,6	80,4	76,6	74,4	71,8	69,3	69,1	1,05
03	92,3	89,4	74,9	83,4	77,8	79,1	77,8	73,6	72,1	70,0	67,5	1,11
04	95,3	91,0	77,4	83,4	77,8	80,8	77,8	76,1	75,3	73,6	73,6	1,05
05	92,7	91,9	66,3	85,9	78,3	79,5	78,3	77,4	75,3	69,7	67,7	0,98
MÉDIA	94,28	91,32	73,50	84,74	77,58	79,80	77,58	74,94	72,70	70,22	68,86	1,07
ERRO	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
PADRÃO	0,80	0,52	2,00	0,55	0,33	0,33	0,28	0,79	1,19	0,88	1,26	0,03

-PM = Potencial de Membrana (média de cinco fibras)

-As concentrações de 3,4-diaminopiridina foram aplicadas cumulativamente, cada concentração foi adicionada ao banho 15 minutos após a adição da anterior

-ACh₁=Despolarização máxima produzida pela ACh antes da adição de 3,4-DAP ao banho

-ACh₂=Despolarização máxima produzida pela ACh após a adição de 3,4-DAP ao banho

-A neostigmine foi adicionada ao banho 30 minutos antes da ACh

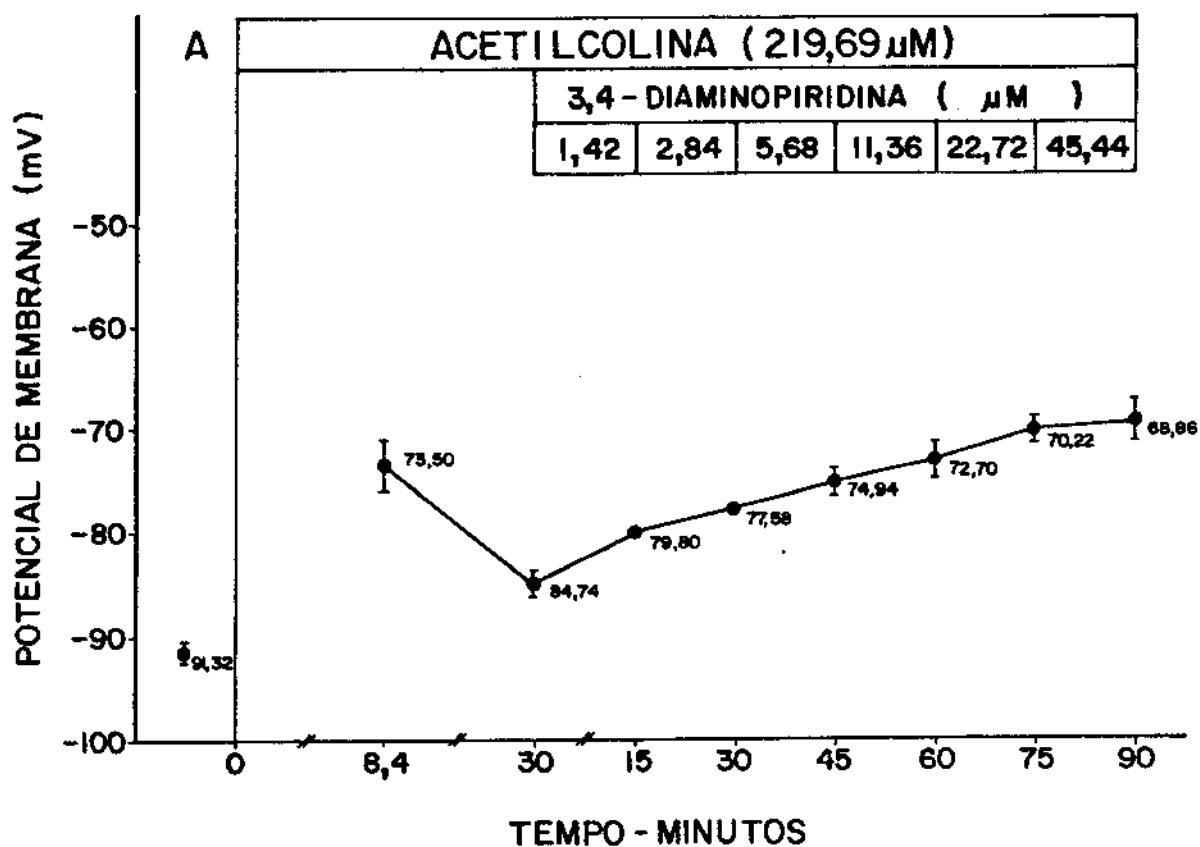


FIGURA - 11

- Efeito antagônico da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal produzida pela acetilcolina (219,69 μ M), no diafragma isolado de rato.
 - Cada ponto representa a média dos potenciais de membrana de cinco experiências.
 - As barras verticais representam o erro padrão da média.
- A - potencial de membrana antes da adição de acetilcolina ao banho.

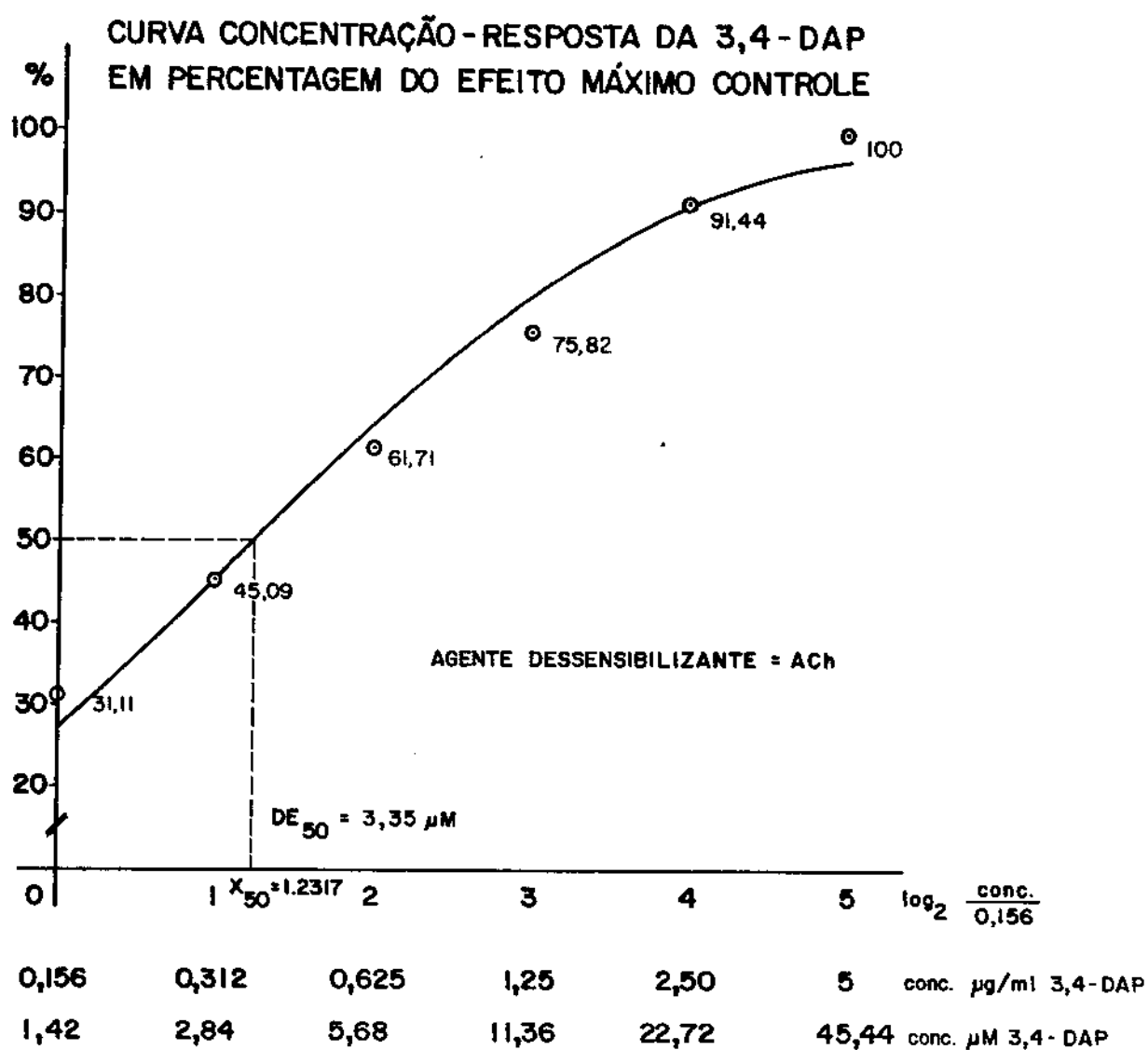


FIGURA - 12

- Curva cumulativa logaritmo da concentração-resposta da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) ajustada pelo método dos "probits". Diafragma isolado de rato dessensibilizado pela acetilcolina-ACh ($219,69 \mu\text{M}$).
- Cada ponto representa os valores percentuais das médias dos potenciais de membrana obtidos com cada concentração cumulativa da 3,4-DAP em porcentagem do efeito máximo controle-grau de dessensibilização (cinco experiências).
- DE_{50} determinada pelo método dos "probits".

TABELA XI - COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE CARBACOL-CCh (800 μ M), DECAMETÔNIO-C₁₀ (478,05 μ M) SUCCINILCOLINA-SCh (110,71 μ M) E ACETILCOLINA-ACh (219,69 μ M) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NA REGIÃO DAS PLACAS TERMINAIS DO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

PM antes adição dos agonistas	POTENCIAL DE MEMBRANA (mV) APÓS ADIÇÃO DOS AGONISTAS				AGONISTA ₁		
	ANTES DA		3,4-DIAMINOPIRIDINA			APÓS 3,4-DIAMINOPIRIDINA	
	Despolarização máx.		Repolarização máx.		Despolarização máx.		
	PM (mV)	t (min)	PM (mV)	t (min)		PM (mV)	AGONISTA ₂
CARBACOL	85,34 [±] 1,86	63,26 [±] 2,86	33,0 [±] 8,74	81,44 [±] 2,64	99,0 [±] 16,83	59,16 [±] 2,54	1,07 [±] 0,02
DECAMETÔNIO	84,40 [±] 1,11	74,28 [±] 2,16	45,0 [±] 8,21	83,14 [±] 2,25	102,0 [±] 5,61	60,72 [±] 1,22	1,22 [±] 0,03
SUCCINILCOLINA	90,10 [±] 1,46	73,54 [±] 2,67	5,4 [±] 1,12	86,48 [±] 2,10	26,4 [±] 4,06	60,10 [±] 2,22	1,23 [±] 0,06
ACETILCOLINA	91,32 [±] 0,52	73,50 [±] 2,00	8,4 [±] 0,60	84,74 [±] 0,55	30,0 [±] 4,74	68,86 [±] 1,26	1,07 [±] 0,03

PM = Potencial de Membrana

-Cada valor representa a média e o respectivo Erro Padrão de cinco experiências

-AGONISTA₁= Despolarização máxima produzida pelos agonistas CCh, C₁₀, SCh e ACh antes da adição de 3,4-DAP ao banho

-AGONISTA₂= Despolarização máxima produzida pelos agonistas CCh, C₁₀, SCh e ACh após a adição de 3,4-DAP ao banho

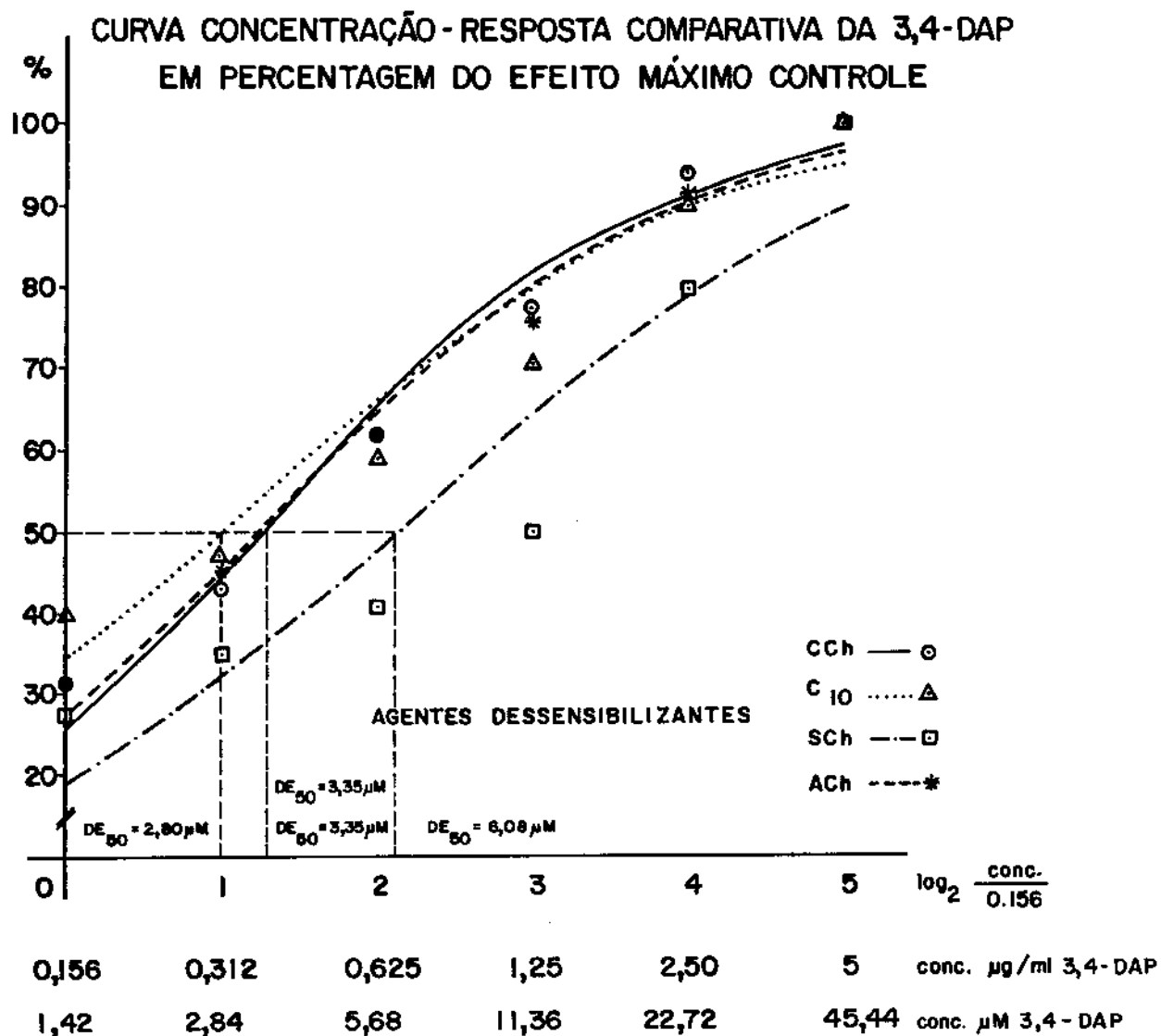


FIGURA - 13

- Curvas cumulativas logaritmo das concentrações-respostas comparativas da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) ajustadas pelo método dos "probits". Diafragma isolado de rato dessensibilizado pelo carbacol-CCh (800 μM), decametônio-C₁₀ (478,05 μM), succinilcolina-SCh (110,71 μM) e acetilcolina-ACh (219,69 μM).
- Cada ponto representa os valores percentuais das médias dos potenciais de membrana obtidos com cada concentração cumulativa de 3,4-DAP em percentagem do efeito máximo controle-grau de dessensibilização produzido por cada agonista (cinco experiências).
- DE₅₀ determinadas pelo método dos "probits".

Efeito da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal em presença de concentrações variáveis de íon cálcio

O efeito da adição de carbacol em presença de 1,8; 7,2 e 14,4 mM de Ca^{++} encontram-se nas TABELAS I, XII e XIII, respectivamente. O efeito da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal em presença de 1,8; 7,2 e 14,4 mM de Ca^{++} encontram-se nas tabelas II, XIV, XV e nas FIGURAS 2, 14 e 16 respectivamente. Os resultados dessas tabelas mostram que são estatisticamente significativas as diferenças no tempo da instalação da despolarização produzida pelo carbacol em presença de 1,8 mM ($33 \pm 8,74$ minutos), 7,2 mM ($18 \pm 3,00$ minutos) e 14,4 mM ($6 \pm 0,94$ minutos) de Ca^{++} . Também é significativa a diferença no tempo da instalação da dessensibilização pelo carbacol em presença de 1,8 mM ($99 \pm 16,83$ minutos) 7,2 mM ($54 \pm 7,64$ minutos) e 14,4 ($12 \pm 1,46$ minutos) de Ca^{++} . Na TABELA XVI podem ser vistos os resultados resumidos dos efeitos da adição de carbacol e da maior concentração de 3,4-diaminopiridina. As curvas logarítmo das concentrações-respostas da 3,4-diaminopiridina em presença de 1,8; 7,2 e 14,4 mM de Ca^{++} encontram-se nas FIGURAS 3, 15 e 17 respectivamente, bem como suas concentrações medianas efetivas e acham-se representadas conjuntamente na FIGURA 18. Pela análise destas curvas pode-se verificar, que as mesmas são paralelas e que o aumento da concentração do Ca^{++} provocou desvios para a direita das curvas logarítmo das concentrações-respostas, sendo estes proporcionais à concentração do íon cálcio na solução de TYRODE.

TABELA XII - EFEITO DA ADIÇÃO DE CARBACOL ($800 \mu\text{M}$) EM PRESENÇA DE $7,2 \text{ mM}$ DE Ca^{++} SOBRE OS POTENCIAIS DE MEMBRANA NA REGIÃO DAS PLACAS TERMINAIS DO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

Exp. n°	PM antes adição CCh (mV)	Despolarização má- xima após CCh		Repolarização máxima após CCh (Dessensibilização)	
		PM (mV)	t (min)	PM (mV)	t (min)
01	88,9	74,0	30	87,2	60
02	88,9	74,0	15	83,4	60
03	93,6	76,1	15	87,6	75
04	88,5	71,5	15	82,5	30
05	92,7	75,3	15	83,4	45
MÉDIA + ERRO PADRÃO	90,52 ± 1,08	74,18 ± 0,78	18 ± 3,00	84,82 ± 1,06	54 ± 7,64

PM = Potencial de Membrana (média de cinco fibras)

TABELA XIII - EFEITO DA ADIÇÃO DE CARBACOL ($800 \mu\text{M}$) EM PRESENÇA DE $14,4 \text{ mM}$ DE Ca^{++} SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NA REGIÃO DAS PLACAS TERMINAIS DO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

Exp. nº	PM antes adição CCh (mV)	Despolarização má- xima após CCh		Repolarização máxima após CCh (Dessensibilização)	
		PM (mV)	t (min)	PM (mV)	t (min)
01	94,4	70,6	3	88,0	15
02	98,7	76,6	6	91,9	15
03	97,4	78,7	9	88,9	15
04	96,6	80,0	6	92,7	9
05	94,0	79,5	6	91,2	9
MÉDIA	96,22	77,08	6,00	90,54	12,60
±	±	±	±	±	±
ERRO PADRÃO	0,89	1,72	0,94	0,78	1,46

PM= Potencial de Membrana (média de cinco fibras)

TABELA XIV - EFEITO DA 3,4-DIAMINOPIRIDINA (3,4-DAP) NA DESSENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR DA PLACA TERMINAL PRODUZIDA, PELO CARBACOL (CCh) EM PRESENÇA DE 7,2 mM DE Ca^{++} , NO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

Exp. nº	PM		Tyrode modificado (Ca ⁺⁺ 7,2mM)	PM		APÓS	CCh		(800.0 μM)				CCh ₁		
	Tyrode normal (Ca ⁺⁺ 1,8mM)	ANTES		ANTES 3,4-DIAMINOPIRIDINA			APÓS	3,4-DIAMINOPIRIDINA		C O N C E N T R A Ç Ã O	3,4-DAP	(μ M)		CCh ₂	
				Despolariza- ção máxima	Repolariza- ção máxima (Dessen sibilização)			Despolariza- ção máxima	Repolariza- ção máxima (Dessen sibilização)						
01	90,2		88,9	74,0	87,2		85,9	84,6	78,3	70,2	68,0	61,2	58,7	57,0	1,30
02	86,3		88,9	74,0	83,4		80,8	77,0	75,7	73,2	65,1	64,6	62,9	60,8	1,22
03	91,9		93,6	76,1	87,6		86,8	84,2	79,5	74,0	73,2	68,9	64,6	62,9	1,21
04	88,5		88,5	71,5	82,5		81,7	79,5	77,0	71,0	68,0	67,2	62,9	61,7	1,16
05	90,6		92,7	75,3	83,4		81,7	79,5	76,6	72,3	67,6	64,2	62,9	60,8	1,24
MÉDIA	89,50		90,52	74,18	84,82		83,38	80,96	77,42	72,14	68,38	65,22	62,40	60,64	1,22
ERRO	±		±	±	±		±	±	±	±	±	±	±	±	±
PADRÃO	0,96		1,08	0,78	1,06		1,23	1,47	0,66	0,69	1,32	1,32	0,98	0,98	0,45

-PM= Potencial de Membrana (média de cinco fibras)

-As concentrações de 3,4-diaminopiridina foram aplicadas cumulativamente, cada concentração foi adicionada ao banho 15 minutos após a adição da anterior

-CCh₁=Despolarização máxima produzida pelo CCh antes da adição de 3,4-DAP ao banho

-CCh₂=Despolarização máxima produzida pelo CCh após a adição de 3,4-DAP ao banho

TABELA XV - EFEITO DA 3,4-DIAMINOPIRIDINA (3,4-DAP) NA DESSENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR DA PLACA TERMINAL PRODUZIDA PELO CARBACOL (CCh) EM PRESENÇA DE 14,4 mM DE Ca^{++} , NO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO.

Exp. nº	PM ANTES CCh (mV)		PM 3,4-DIAMINOPIRIDINA Despolariza- ção máxima	Repolarização máxima(Dessen- sibilização)	APÓS	CCh	(800 μ M)						CCh ₁	
	Tyrode normal ⁺⁺ (Ca 1,8mM)	Tyrode Mo- dificado ⁺⁺ (Ca 14,4mM)					APÓS	3,4- DIAMINOPIRIDINA						
								C O N C E N T R A Ç Ã O 3,4-DIAMINOPIRIDINA (μ M)						
					1,42	2,84	5,68	11,36	22,72	45,44	90,88	181,76	363,52	
01	89,8	94,4	70,6	88,0	87,6	86,3	85,1	84,2	74,0	73,6	66,3	65,5	63,4	1,11
02	98,7	98,7	76,6	91,9	91,0	90,2	89,8	85,5	82,1	80,8	80,0	74,4	72,3	1,05
03	85,1	97,4	78,7	88,9	87,8	86,3	85,9	85,1	81,7	81,2	79,1	77,4	72,7	1,08
04	95,3	96,6	80,0	92,7	91,9	89,3	86,3	80,0	78,3	72,3	70,2	63,8	61,2	1,30
05	89,8	94,0	79,5	91,2	90,2	89,3	86,8	82,5	80,4	75,7	75,3	71,9	70,2	1,13
MÉDIA	91,74	96,22	77,08	90,54	89,70	88,28	86,78	83,46	79,30	76,72	74,18	70,60	67,96	1,13
ERRO	+	±	±	±	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±
PADRÃO	2,37	0,89	1,72	0,78	0,86	0,82	0,80	1,00	1,48	1,83	2,61	2,59	2,37	0,04

-PM= Potencial de Membrana (média de cinco fibras)

-As concentrações de 3,4-diaminopiridina foram aplicadas cumulativamente, cada concentração foi adicionada ao banho 15 minutos após a adição da anterior

-CCh₁=Despolarização máxima produzida pelo CCh antes da adição de 3,4-DAP ao banho

-CCh₂=Despolarização máxima produzida pelo CCh após a adição de 3,4-DAP ao banho

-PM antes do CCh e após Tyrode modificado foi determinado 30 minutos após sua adição

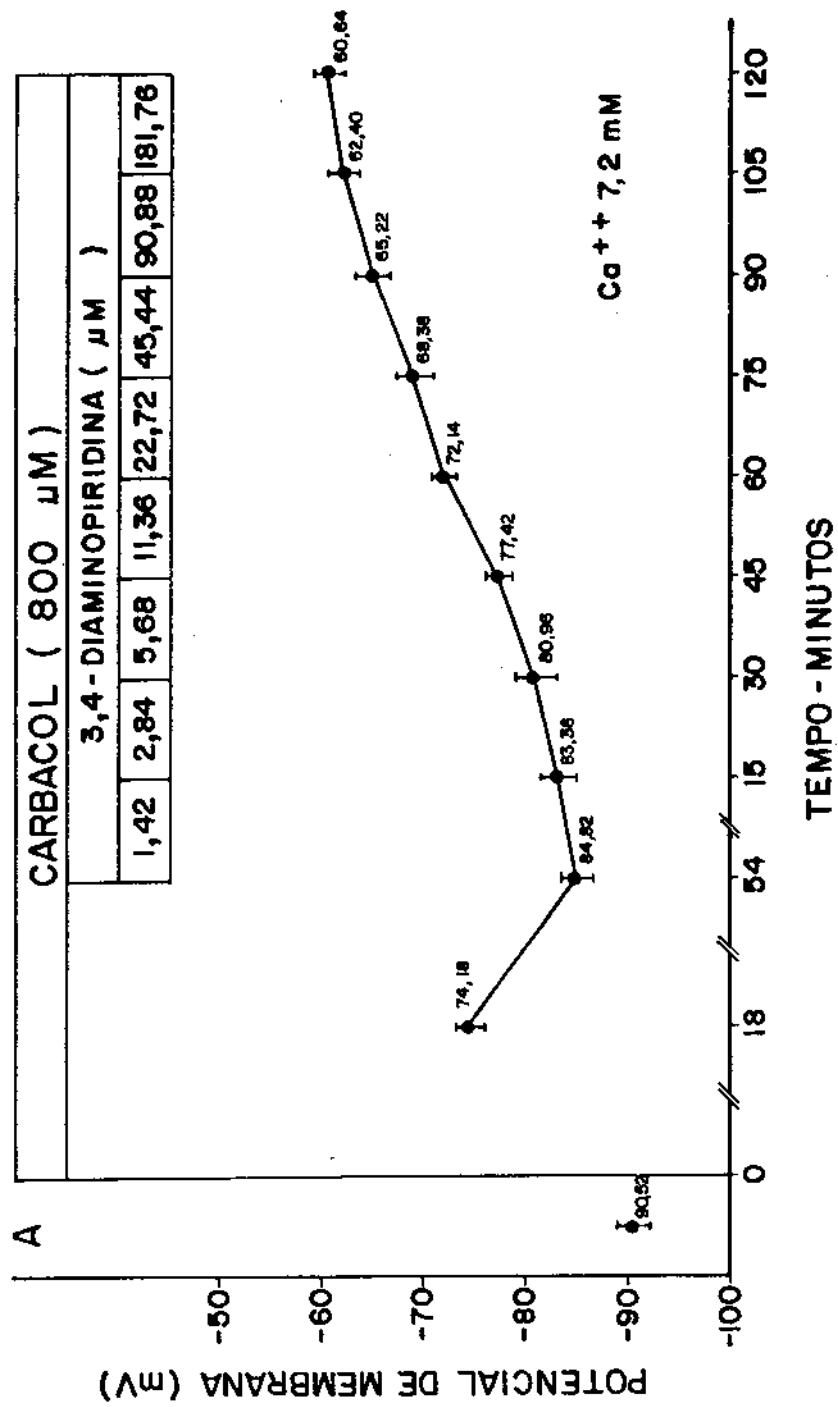


FIGURA - 14

FIGURA - 14

- Efeito antagônico da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal produzido pelo carbachol (800 μM) em presença de 7,2 mM de Ca^{++} no diafragma isolado de rato.
 - Cada ponto representa a média dos potenciais de membrana de cinco experiências.
 - As barras verticais representam o erro padrão da média.
- A.- Potencial de membrana antes da adição de carbachol ao banho.

CURVA CONCENTRAÇÃO - RESPOSTA DA 3,4-DAP EM PRESENÇA DE Ca^{++} 7,2 mM EM PERCENTAGEM DO EFEITO MÁXIMO CONTROLE

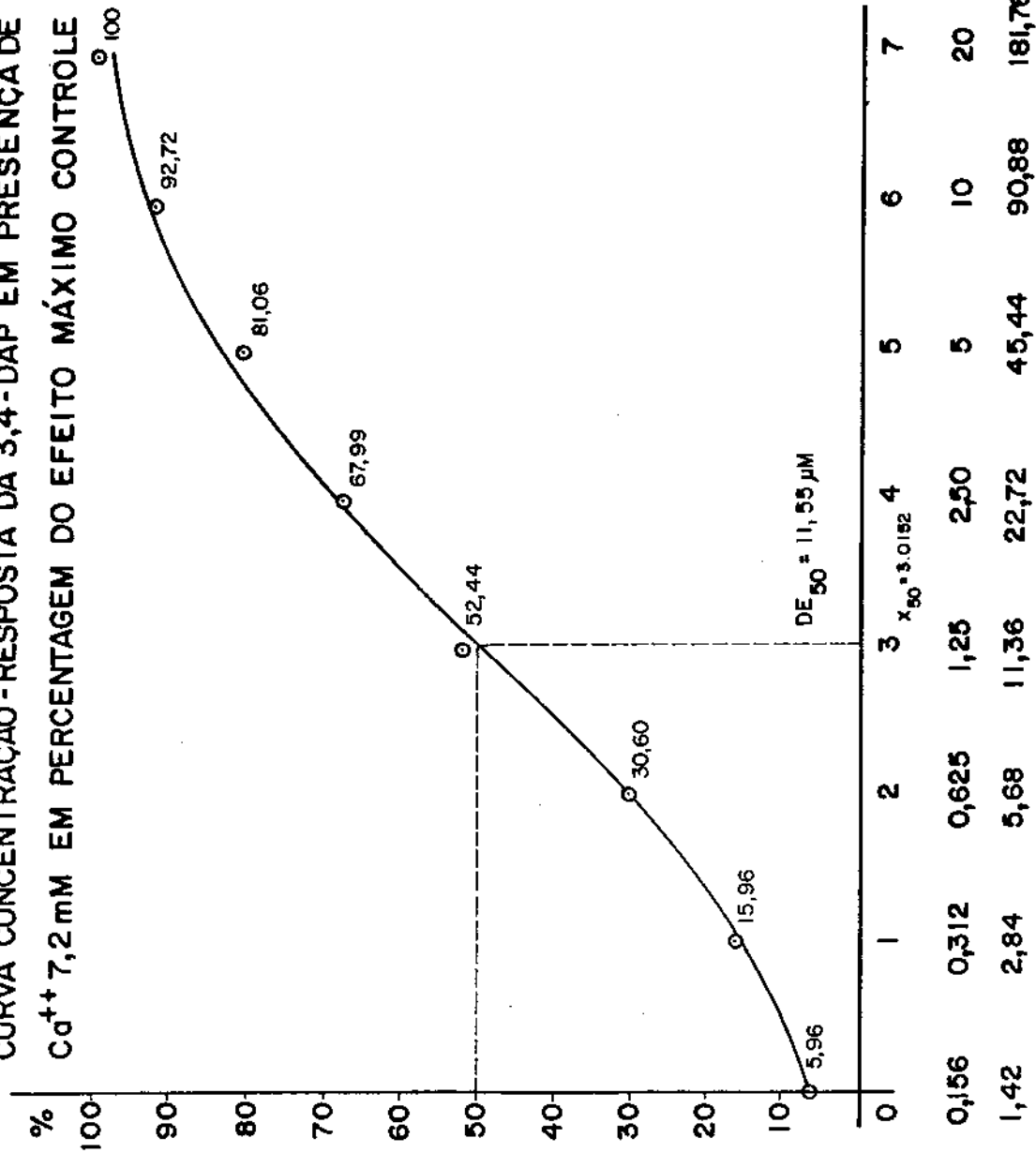


FIGURA - 15

FIGURA - 16

- Efeito antagônico da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) na dessensibilização do receptor da placa terminal produzido pelo carbacol (800 μ M) em presença de Ca^{++} 14,4 mM, no diafragma isolado de rato.
 - Cada ponto representa a média dos potenciais de membrana de cinco experiências.
 - As barras verticais representam o erro padrão da média.
- A - Potencial de membrana antes da adição de carbacol ao banho.

TABELA XVI - COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE CARBACOL-CCh (800 μ M) EM PRESENÇA DE 1,8 mM, 7,2 mM e 14,4 mM de Ca^{++} NO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO, ANTES E APÓS A ADIÇÃO DE 3,4-DIAMINOPIRIDINA (3,4-DAP) AO BANHO.

	PM antes adição CCh (mV)	POTENCIAL DE MEMBRANA (mV)				APÓS Despolarização máx. t (min)	ADIÇÃO CARBACOL		CCh ₁ CCh ₂
		ANTES DA		3,4-DIAMINOPIRIDINA			APÓS 3,4-DIAMINOPIRIDINA		
		Despolarização máx.		Repolarização máx.			Despolarização máx.		
		PM (mV)	t (min)	PM (mV)	t (min)		PM (mV)		
Ca ⁺⁺ 1,8 mM	85,34 [±] 1,86	63,26 [±] 2,86	33 [±] 8,74	81,44 [±] 2,64	99 [±] 16,83		59,16 [±] 2,54		1,07 [±] 0,02
Ca ⁺⁺ 7,2 mM	90,52 [±] 1,08	74,18 [±] 0,78	18 [±] 3,00	84,82 [±] 1,06	54 [±] 7,64		60,64 [±] 0,98		1,22 [±] 0,45
Ca ⁺⁺ 14,4 mM	96,22 [±] 0,89	77,08 [±] 1,72	6 [±] 0,94	90,54 [±] 0,78	12,6 [±] 1,46		67,96 [±] 2,37		1,13 [±] 0,04

PM = Potencial de Membrana

Cada valor representa a média e o respectivo erro padrão (cinco experiências)

-CCh₁=Despolarização máxima produzida pelo carbacol antes da adição de 3,4-DAP ao banho

-CCh₂=Despolarização máxima produzida pelo carbacol após a adição de 3,4-DAP ao banho

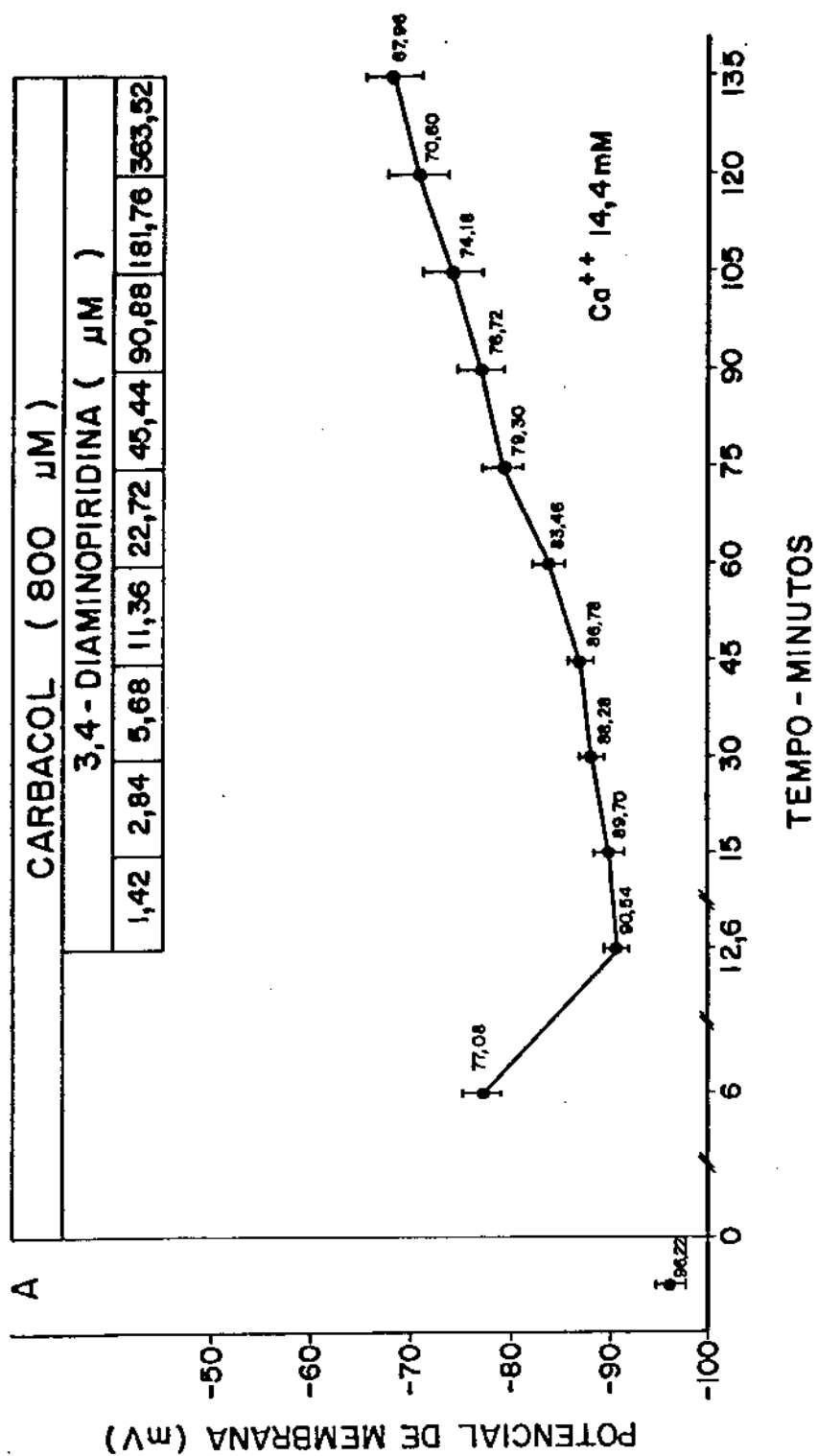


FIGURA - 16

FIGURA - 15

- Curva cumulativa logaritmo da concentração-resposta da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP), ajustada pelo método dos "probits". Diafragma isolado de rato dessensibilizado pelo carbacol - CCh (800 μ M) em presença de 7,2 mM de Ca^{++} .
- Cada ponto representa os valores percentuais das médias dos potenciais de membrana obtidos com cada concentração cumulativa de 3,4-DAP em percentagem do efeito máximo controle-grau de dessensibilização (cinco experiências).
- DE_{50} determinada pelo método dos "probits".

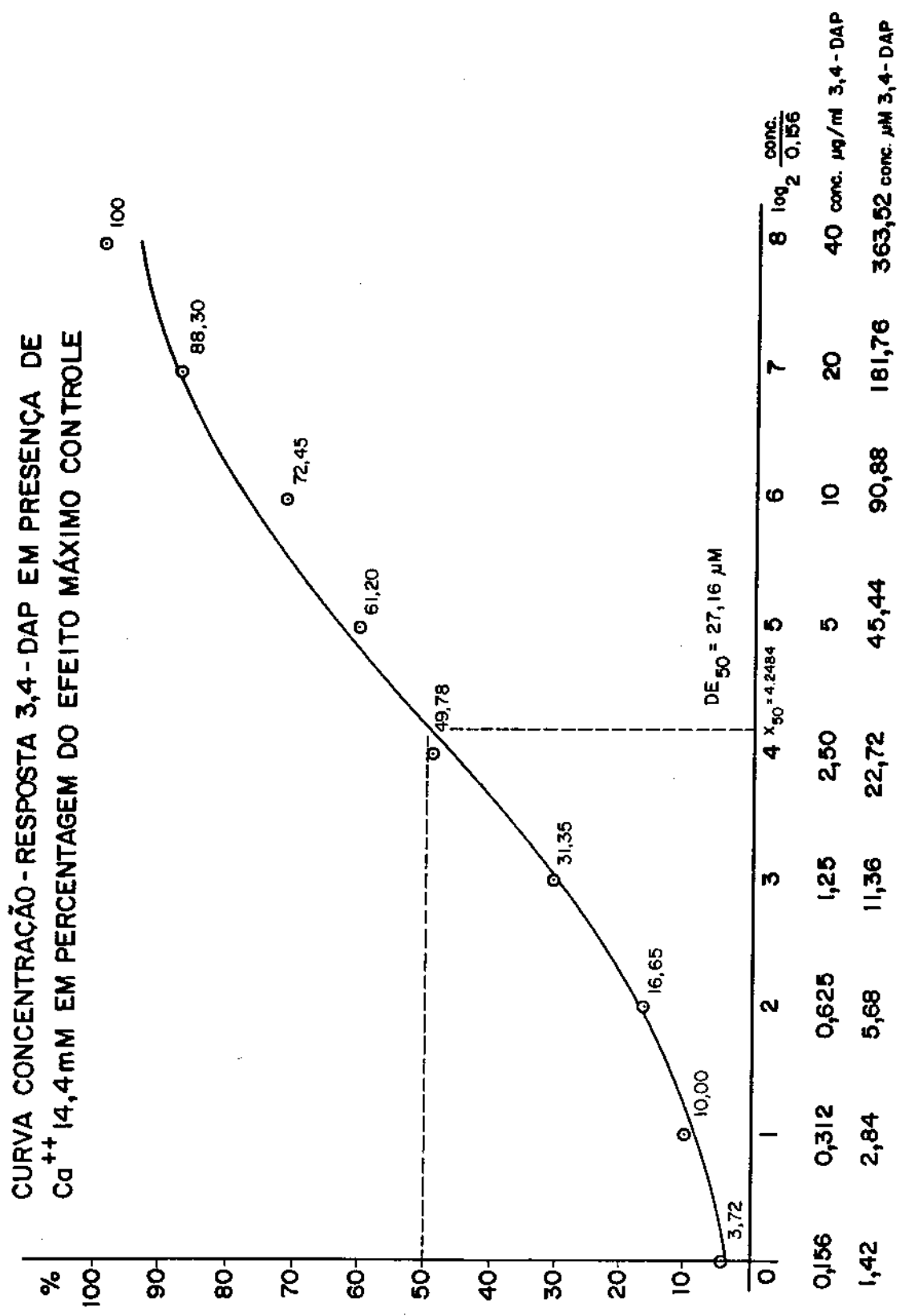


FIGURA - 17

FIGURA - 17

- Curva cumulativa logaritmo da concentração-resposta da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) ajustada pelo método dos "probits". Diafragma isolado de rato dessensibilizado pelo carbacol-CCh (800 μ M) em presença de 14,4 mM de Ca^{++} .
- Cada ponto representa os valores percentuais das médias dos potenciais de membrana obtidos com dada concentração cumulativa de 3,4-DAP em percentagem do efeito máximo contrôle-grau de dessensibilização (cinco experiências).
- DE_{50} determinada pelo método dos "probits".

CURVA CONCENTRAÇÃO - RESPOSTA DA 3,4-DAP EM PRESENÇA DE Cd^{++} 1,8, Cd^{++} 7,2 e Cd^{++} 14,4 mM EM PERCENTAGEM DO EFEITO MÁXIMO CONTROLE

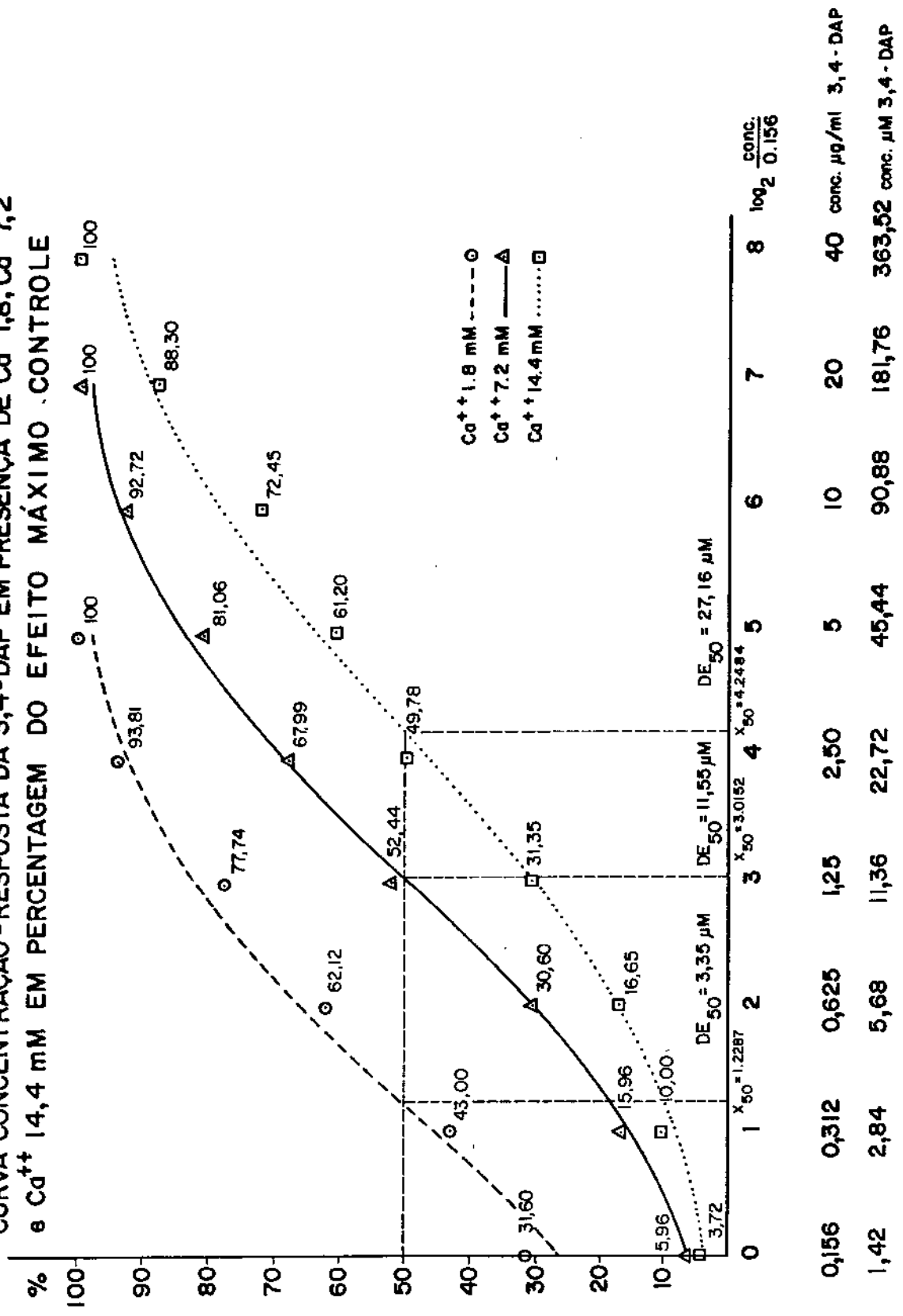


FIGURA - 18

FIGURA - 18

- Curvas cumulativas logaritmo das concentrações-respostas comparativas de 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP), ajustadas pelo método dos "probits". Dâfragma isolado de rato des-sensibilizado pelo carbacol ($800 \mu\text{M}$) em presença de variáveis concentrações de Ca^{++} .
- Cada ponto representa os valores percentuais das médias dos potenciais de membrana obtidos com cada concentração cumulativa de 3,4-DAP em percentagem do efeito máximo controle (cinco experiências).
- DE_{50} determinadas pelo método dos "probits".

A análise pelo método da regressão linear mostrou não haver diferença significativa nos desvios do paralelismo quando se comparam as retas de regressão da 3,4-diaminopiridina em presença de 1,8; 7,2 e 14,4 mM de Ca^{++} . Mas, houve diferença significativa quando se compararam os afastamentos entre elas (FIGURA 19), sendo também estes afastamentos proporcionais às concentrações do íon cálcio na solução nutritiva.

RETAS DE REGRESSÃO ENTRE 3,4-DAP E
 Ca^{++} 1,8, Ca^{++} 7,2 e Ca^{++} 14,4 mM

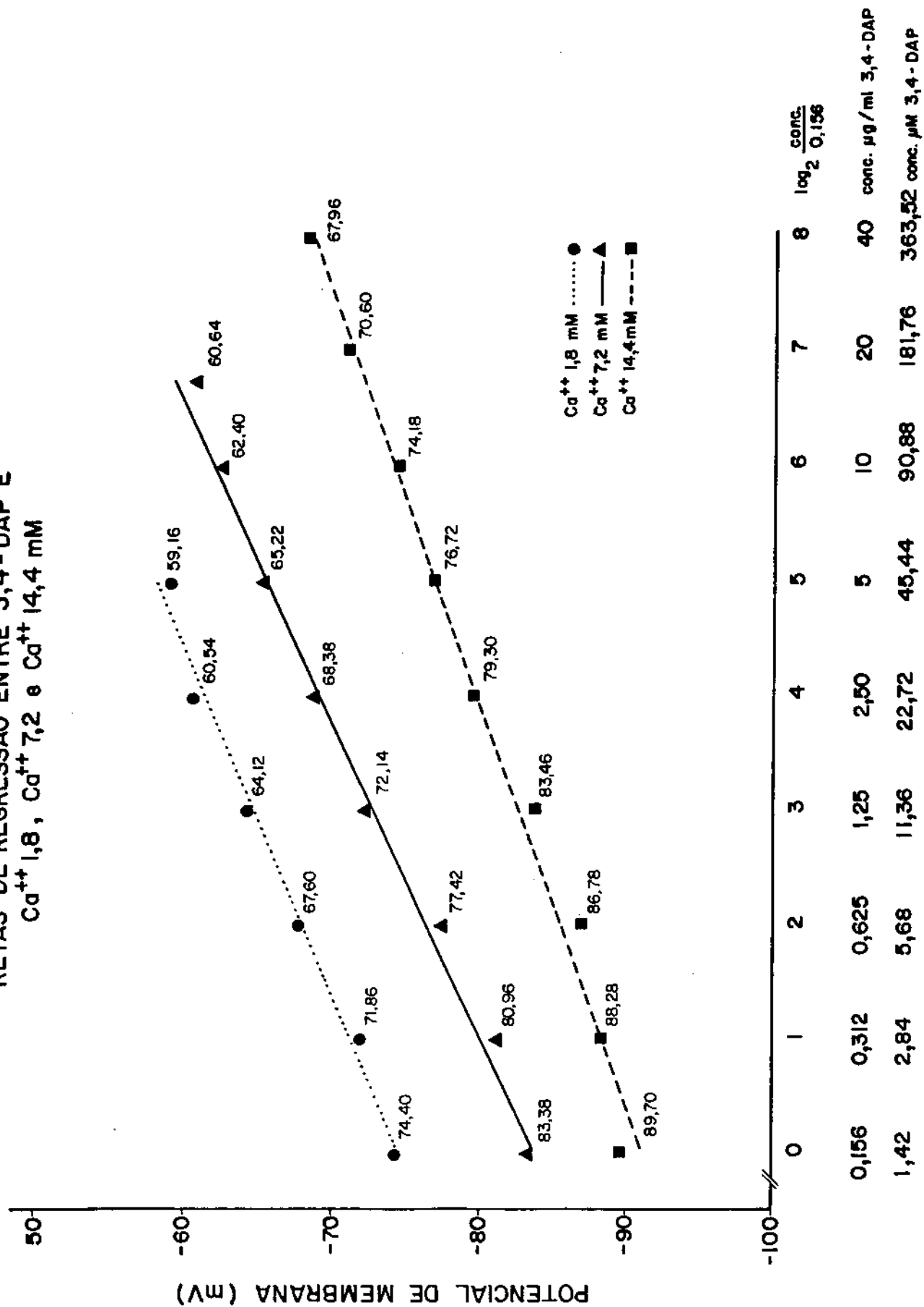


FIGURA - 19

FIGURA - 19

- Comparação dos efeitos da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) na dessensibilização do receptor da placa terminal produzida pelo carbacol - CCh (800 μ M) no diafragma isolado de rato em presença de variáveis concentrações de Ca^{++} , pelo método da regressão linear.
- Cada ponto representa o valor médio dos potenciais de membrana obtido com cada concentração cumulativa de 3,4-Diaminopiridina (cinco experiências).

V - D I S C U S S A O

V - DISCUSSÃO

Pesquisas recentes mostram que o processo de dessensibilização é bifásico (FELTZ e TRAUTMANN, 1980, 1982, ANWYL e NARAHASHI, 1980, CLARK e ADAMS, 1981), isto é, compõe-se de uma fase rápida (que se instala em poucos segundos ou mesmo fração de segundos) e outra lenta (de instalação em dezenas de segundos ou de minutos). A fase rápida é revelada somente com o uso de aplicação microiontoforética do agonista ou do emprego de técnicas de super fusão local que permitam alterar em poucos segundos a solução que banha a placa terminal (PENNEFATHER e QUASTEL, 1982). A fase lenta depende da persistência do agonista na biofase por tempo relativamente longo, superior a 2 minutos segundo FELTZ e TRAUTMANN (1982) e aparece com os métodos usuais de aplicação dos agonistas (adição ao banho ou perfusão da preparação com solução que o contenha).

Em trabalho anterior (VITAL BRAZIL et al., 1982) e no presente usamos a aplicação do agonista pela sua adição ao banho. De modo geral, para qualquer agonista empregado a despolarização e a dessensibilização se processaram de modo muito lento. Portanto, o efeito das aminopiridinas e o antagonismo do Ca^{++} referem-se somente à fase lenta da dessensibilização.

Os agonistas empregados apesar de agirem de maneira qualitativamente similar, diferiram quantitativamente em relação aos tempos de desenvolvimento tanto da despolarização quanto da repolarização. Não foram significativas as diferenças entre os tempos médios da despolarização e repolarização das placas terminais produzidas pelo carbacol e pelo decametônio. Tam-

bém causaram despolarização e repolarização das placas terminais em tempos não significativamente diferentes, a succinilcolina e a acetilcolina (TABELA XI). Entretanto foram significativas as diferenças dos tempos de despolarização e repolarização causadas de um lado pelo carbacol e decametônio e de outro pela succinilcolina e acetilcolina, sendo que o maior ritmo tanto da despolarização quanto da repolarização foi observado com o uso da succinilcolina e da acetilcolina (TABELA XI). Os resultados obtidos por diferentes autores quanto à velocidade da dessensibilização causada por diferentes agonistas não são concordes. THESLEFF (1955 a) não registrou diferenças acentuadas no ritmo da despolarização e da dessensibilização provocada na preparação ciático-sartório da rã, pela acetilcolina, decametônio, succinilcolina e nicotina. Também no diafragma de rato não registrou diferença no ritmo de despolarização e de dessensibilização destes quatro agonistas. Apesar de termos usado as mesmas concentrações que THESLEFF em suas experiências na preparação nervo frênico-diafragma de rato, o ritmo da despolarização e da dessensibilização com o uso de qualquer um dos agonistas foi mais lento em nossas experiências do que os registrados por aquele autor. Uma possibilidade de que talvez explique essa discrepância resida no fato de que tenhamos adicionado, como já referido, os agonistas em pequenos volumes ao banho e THESLEFF o tenha feito pela substituição da solução nutritiva com outra contendo o agonista. Essa técnica elimina o processo de difusão da droga no líquido nutritivo que banha a preparação. Deve-se registrar que o processo de aplicação do agonista parece exercer influência decisiva em relação às diferenças no ritmo da dessensibilização provocada pelos vários

agonistas. Os autores que utilizaram a aplicação local do agonista e que portanto, estudaram a dessensibilização rápida, não registraram diferenças significativas no ritmo causado pelos vários agonistas: acetilcolina, carbacol e succinilcolina (KATZ e THESLEFF, 1957), butirilcolina, suberildicolina, decametônio e tetrametilamônio (MAGAZANIK, 1968) e acetilcolina, acetiltiocolina, tetrametilamônio e feniltrimetilamônio (ANWYL e NARAHASHI, 1980). Entretanto os autores que usaram outros processos de aplicação dos agonistas e que portanto estudaram a dessensibilização lenta mostraram que o feniltrimetilamônio e C_{13} - bistrimetilamônio dessensibilizam os receptores mais rapidamente que outros (GISSEN e NASTUK, 1966, RANG e RITTER, 1970).

Os resultados da presente pesquisa relativos aos efeitos da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal produzido pelos agonistas carbacol, decametônio, succinilcolina e acetilcolina, mostraram que a ação independe do agonista causador da dessensibilização. A 3,4-diaminopiridina agiu de forma similar na dessensibilização produzida por todos sendo seu efeito concentração-dependente. As curvas logarítmicas das concentrações-respostas da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização do receptor produzida pelo carbacol, decametônio, succinilcolina e acetilcolina apresentaram forma sigmóide e foram paralelas (FIGURA XI). A atividade da 3,4-diaminopiridina na dessensibilização produzida pelos vários agonistas foi a mesma. As diferenças registradas, mesmo no caso da dessensibilização produzida pela succinilcolina não foram estatisticamente significativas.

Outro resultado consistente em nosso estudo mostra que a despolarização produzida pelos agonistas após

o uso da maior concentração de 3,4-diaminopiridina foi superior àquela causada na ausência de 3,4-diaminopiridina. A explicação para este achado pode estar relacionada com as hipóteses de KATZ e THESLEFF (1957) e HEIDMANN e CHANGEAUX (1979 a). De acordo com estes autores, a membrana em repouso contém uma pequena proporção de receptores no estado dessensibilizado. A 3,4- diaminopiridina revertendo esses receptores para o estado de repouso, os tornariam sensíveis à ação despolarizante dos agonistas presentes no banho.

Quando comparamos os efeitos da 3,4-diaminopiridina com os da 4-aminopiridina verificamos que agem de forma similar na inibição da dessensibilização do receptor da placa terminal. As curvas logarítmo das concentrações-respostas da 3,4-diaminopiridina e da 4-aminopiridina de forma sigmóide foram paralelas. A similaridade do efeito causado pelas duas aminopiridinas também se confirmou no paralelismo de 1º, 2º e 3º graus obtido através da análise de variância pelos polinômios ortogonais . Entretanto, a 3,4-diaminopiridina mostrou-se mais potente que a 4-aminopiridina na capacidade de reverter os receptores do estado dessensibilizado para o de repouso, sendo aproximadamente 5 vezes mais ativa que a 4-aminopiridina. Este resultado pode ser evidenciado pelo afastamento entre as curvas logarítmo das concentrações-respostas da 3,4-diaminopiridina e 4-aminopiridina, pela determinação da potência pela simples relação entre as concentrações medianas efetivas, pela relação entre as concentrações que produziram efeito máximo e pela determinação de atividade entre as duas pelo método da dosagem biológica quantitativa a 8 pontos. MOLGÓ e colaboradores (1980) demonstraram ser

a 3,4-diaminopiridina 6 a 7 vezes mais potente que a 4-aminopiridina em aumentar os quanta de acetilcolina liberados por impulso nervoso em preparações neuromusculares de camundongos e ratos bloqueados respectivamente pelo Mg^{++} e pela toxina botulínica. Este valor não se acha muito distante do obtido em ação completamente distinta exercida pelas duas aminopiridinas.

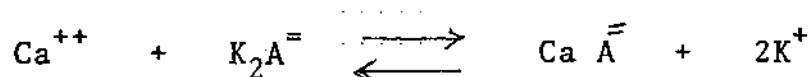
Com relação à influência do íon cálcio na dessensibilização do receptor da placa terminal, os resultados mostram relação direta entre o ritmo de desenvolvimento da dessensibilização e os aumentos das concentrações de Ca^{++} na solução nutritiva (TABELA XVI). Estão concordes com os descritos na literatura por MANTHEY (1966, 1970, 1972), NASTUK e LIU (1966), MAGAZANIK (1968), MAGAZANIK e VYSKOČIL (1970), LAMBERT e PARSONS (1970), NASTUK e PARSONS (1970) e PARSONS et al. (1971). Em desacordo se encontram os estudos de ANWYL NARAHASHI (1980). Segundo estes autores a variação do Ca^{++} externo entre 0 a 50 mM, ou a perfusão com agentes que aumentam o teor do cálcio intracelular tais como o 2,4-dinitrofenol e os ionóforos cálcicos X537A e A23187 não alteram o tempo médio da dessensibilização.

Houve em nossas experiências maior rapidez de desenvolvimento da despolarização quando se aumentaram as concentrações de Ca^{++} na solução nutritiva, embora a despolarização tenha sido menos intensa. Essa rapidez no aparecimento da despolarização foi seguida pari passu por maior rapidez no aparecimento da dessensibilização (TABELA XVI). Verificou-se também essa correlação nas experiências com o uso de concentração usual de Ca^{++} na solução de TYRODE (1,8 mM) e vários agonistas. O carbachol e decametônio produziram despolarização e dessensibilização

mais lentamente. Com a succinilcolina e acetilcolina houve maior rapidez na instalação da despolarização e também na da dessensibilização. Não encontramos referência na literatura a uma possível correlação entre o ritmo da ativação e o da dessensibilização do receptor colinérgico. Deve-se ter presente que alguns fatores afetam a cinética da ativação e da dessensibilização de forma sinérgica e outros de forma antagônica. Por exemplo, a hiperpolarização da membrana pós-juncional retarda a instalação da ativação (KORDAS, 1969, 1972, MAGLEBY e STEVENS, 1972 a, b) mas acelera o início da dessensibilização (KORDAS, 1969, MAGAZANIK e VYSKOČIL, 1970, 1973, 1975, MAGLEBY e STEVENS, 1972 a, b). Já, a diminuição da temperatura afeta do mesmo modo ambos os processos, retardando tanto a instalação da ativação (KORDAS, 1972, MAGLEBY e STEVENS, 1972 b) como a da dessensibilização (KORDAS 1972, MAGLEBY e STEVENS, 1972 b, MAGAZANIK e VYSKOČIL, 1973, 1975).

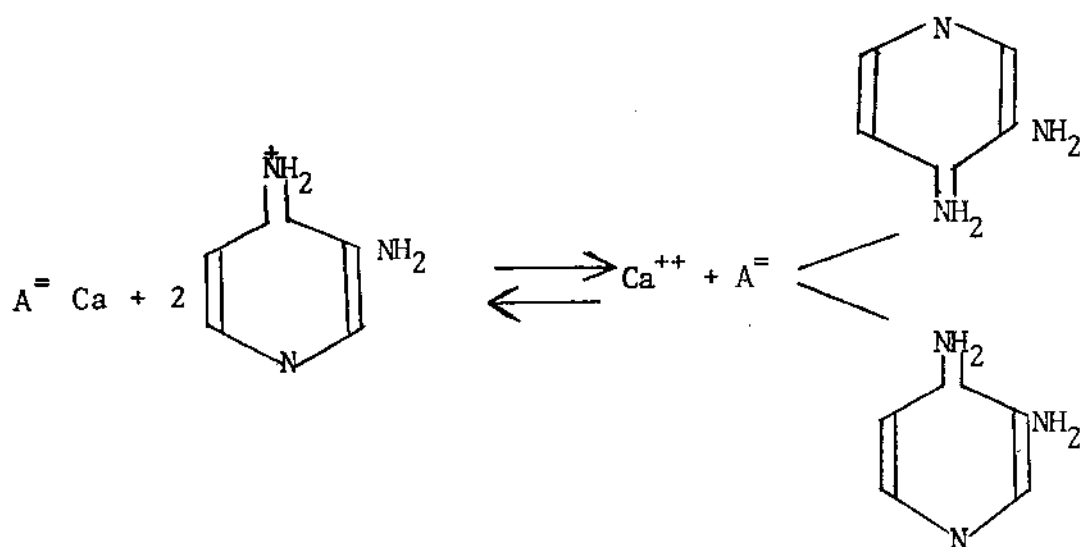
MANTHEY demonstrou em 1966 que a velocidade de dessensibilização depende das concentrações de cálcio, sódio e potássio no líquido extracelular. Utilizando o músculo sartório da rã, demonstrou que o cálcio acelera consideravelmente o aparecimento da dessensibilização produzida pelo carbacol e que o aumento de sua concentração de 0 para 10 mM aumenta em aproximadamente 7 vezes a velocidade de desenvolvimento da mesma. O aumento quer do sódio quer do potássio antagoniza o efeito daquele íon. MANTHEY (1966) formulou duas hipóteses para explicar o fenômeno. Uma delas seria a de que o efeito do cálcio resultaria da ação bem conhecida deste íon de estabilizar as membranas excitáveis. Na outra, a ação do cálcio seria necessária para converter o receptor da forma ativa para a inativa segundo o esquema de KATZ e THESLEFF (1957). Em pesquisa posterior optou pela última

pois verificou que o efeito do cálcio no processo de dessensibilização aparece somente após 13 segundos da perfusão das placas terminais com a solução de carbacol (MANTHEY, 1970). Formulou então a hipótese, de que o sítio em que o cálcio atua, se bem que talvez na membrana, não é a ele acessível quando o receptor não se encontra ativado. A ativação do receptor, a par de aumentar a permeabilidade aos íons sódio e potássio, também o faz em relação ao íon cálcio. O aumento da permeabilidade a este último permitiria que atingisse o sítio em que atua acelerando o aparecimento da dessensibilização. Reinvestigando em 1972, o antagonismo cálcio-potássio no fenômeno da dessensibilização, MANTHEY propõe um simples mecanismo de troca iônica para explicar o efeito do Ca^{++} e o do K^+ . Um íon cálcio trocava com dois íons potássio em sítio aniônico divalente ($\text{A}^{=}$) somente acessível a cations do meio externo após o aumento da condutância da membrana produzido pelo agonista:



Verificamos na presente pesquisa que são paralelas as curvas logarítmo das concentrações-respostas da 3,4-diaminopiridina em presença de 1,8; 7,2 e 14,4 mM de Ca^{++} . Além do paralelismo, os aumentos das concentrações do Ca^{++} causaram desvios das curvas para a direita proporcionais à sua concentração (FIGURA 18). O deslocamento sofrido pelas retas de regressão em presença de 1,8 e 14,4 mM de Ca^{++} foi o dobro do deslocamento sofrido pelas retas de regressão em presença de 1,8 mM e 7,2 mM de Ca^{++} (FIGURA 19). Isto mostra que os aumentos das concentrações efetivas de 3,4-diaminopiridina foram proporcionais aos aumentos da concentração do Ca^{++} na solução nutritiva. Segundo

ARIËNS e colaboradores (1964) o mecanismo competitivo entre dois compostos será demonstrado pelo paralelismo entre as curvas logarítmicas das concentrações-respostas do agonista em presença de concentrações diferentes do antagonista e pela proporcionalidade do deslocamento das curvas e das concentrações do antagonista. Diante do exposto concluímos que a 3,4-diaminopiridina atua competitivamente com o Ca^{++} no mesmo receptor, isto é, que são antagonistas competitivos. Os resultados da presente pesquisa sugerem, pois, que o efeito das aminopiridinas em reverter o receptor de sua forma dessensibilizada para a de repouso resulta do deslocamento do cálcio do sítio aniônico (A^-) pela aminopiridina segundo o esquema (no qual usamos a fórmula de uma das formas da 3,4-diaminopiridina protonada):



VI- C O N C L U S Õ E S

VI - CONCLUSÕES

- 1º) A 3,4-diaminopiridina atua de modo qualitativamente similar à 4-aminopiridina na reversão do receptor da placa terminal de sua forma dessensibilizada para a de repouso, sendo aproximadamente 5 vezes mais ativa. O fato de duas aminopiridinas exercerem a mesma ação sugere que tal propriedade seja comum a todas como o é a de inibir o canal do potássio.
- 2º) A 3,4-diaminopiridina reverte o receptor de sua forma dessensibilizada para a de repouso qualquer que tenha sido o agonista empregado para induzir a dessensibilização.
- 3º) O antagonismo entre o ion cálcio e a 3,4-diaminopiridina no fenômeno da dessensibilização é competitivo. Esta verificação sugere que as aminopiridinas inibam a dessensibilização deslocando o cálcio do sítio com o qual a ligação deste e de outros cations di e trivalentes é necessária para que ocorra a inativação do receptor da placa terminal.
- 4º) A despolarização produzida pelos agonistas após a ação da 3,4-diaminopiridina foi superior àquela produzida antes da ocorrência do fenômeno da dessensibilização. Este fato sugere a existência de um certo número de receptores no estado dessensibilizado na ausência de agonistas.

VII- R E S U M O

VII - RESUMO

VITAL BRAZIL e colaboradores (VITAL BRAZIL e FONTANA, 1982, VITAL BRAZIL et al., 1982) verificaram que a 4-aminopiridina inibe a dessensibilização provocada pelo carbacol e que este efeito é antagonizado pelo íon cálcio. Na presente pesquisa estudou-se o efeito de outra aminopiridina, a 3,4-diaminopiridina, na dessensibilização do receptor colinérgico e comparou-se a potência desta com a da 4-aminopiridina neste fenômeno. Estudou-se também o efeito da 3,4-diaminopiridina sobre a dessensibilização provocada por vários agonistas (carbacol, decametônio, succinilcolina e acetilcolina) a fim de esclarecer se seu efeito depende do agente causador da dessensibilização. Finalmente, pesquisou-se o efeito da 3,4-diaminopiridina sobre a dessensibilização em presença de várias concentrações de íon cálcio, a fim de verificar a natureza do antagonismo existente entre este cation e a 3,4-diaminopiridina.

A pesquisa foi realizada na preparação isolada nervo frênico-diafragma de rato, determinando-se o potencial de membrana na região das placas terminais com o emprego de microeletrodo intracelular. A solução nutritiva empregada foi a de TYRODE. Temperatura do banho 37°C. Oxigenação com carbogênio. A 3,4-diaminopiridina e 4-aminopiridina foram adicionadas ao banho após a dessensibilização dos receptores colinérgicos da placa terminal em concentrações cumulativas.

Os resultados mostram que a 3,4-diaminopiridina, tal como a 4-aminopiridina foi capaz de inibir a dessensibilização do receptor colinérgico. Não houve diferença significativa

tiva nos desvios do paralelismo obtidos para análise de variância, através dos polinômios ortogonais, e entre as curvas logarítmo das concentrações-respostas da 3,4-diaminopiridina e 4-aminopiridina. Foi entretanto significativa a diferença nos afastamentos entre elas. A DE_{50} da 3,4-diaminopiridina e da 4-aminopiridina determinada pelo método dos "probits" foi de $3,35 \mu M$ e $17,34 \mu M$ respectivamente. A relação de atividade entre as duas determinada pela simples relação entre as DE_{50} foi de 5,2 vezes e pelo método da dosagem biológica quantitativa a 8 pontos de 4,48 vezes com intervalo de confiança de 3,83 a 5,25 vezes. Não houve diferença significativa nos desvios do paralelismo e nos afastamentos das curvas logarítmo das concentrações-respostas da 3,4-diaminopiridina quando a dessensibilização foi provocada pelo carbacol, decametônio, succinilcolina ou acetilcolina. Quando se aumentou a concentração de cálcio na solução nutritiva, um aumento proporcional da concentração de 3,4-diaminopiridina foi requerido para reverter os receptores de sua forma dessensibilizada para a de repouso. Não houve diferença significativa nos desvios do paralelismo entre as retas de regressão e entre as curvas logarítmo das concentrações-respostas da 3,4-diaminopiridina em presença de 1,8, 7,2 e 14,4 mM de Ca^{++} . Foi contudo, estatisticamente significativa a diferença nos afastamentos entre elas, sendo estes proporcionais às concentrações de Ca^{++} na solução nutritiva. A despolarização produzida pelos agonistas após o emprego da 3,4-diaminopiridina foi superior àquela produzida antes da ocorrência do fenômeno da dessensibilização.

VIII - REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.R. (1975) A study of desensitization using voltage clamp Pflugers Arch., 360:135-44.
- ADAMS, P.R. (1976) Drug blockage of open end-plate channels. J.Physiol., 260:531-52.
- ALBUQUERQUE, E.X.; KUBA, K.; DALY, J. (1974) Effect of histrio nicotoxin on the ionic conductance modulator of the cholinergic receptor; a quantitative analysis of the end-plate current. J.Pharmacol.exp. Ther., 189:513-24.
- ANWYL, R. & NARAHASHI, T. (1980) Desensitization of the acetyl choline receptor of denervated rat soleus muscle and the effect of calcium. Br.J.Pharmacol., 69:91-8.
- ARIËNS, E.J.; SIMONIS, A.M.; VAN ROSSUM, J.M. (1964) Drug-receptor interaction; interaction of one or more drugs with one receptor system. In: ARIËNS, E.J. ed. Molecular pharmacology ; the mode of action of biologically active compounds. New York, Academic. v.1, sect.2, p.119-393.
- BENNETT, M.V.L., WURZEL, M.; GRUNDFEST, H. (1961) The electrophysiology of electric organs of marine electric fishes. I. Properties of electroplaques of Torpedo nobiliana. J.gen.Physiol., 44:757-804.
- BON, C. & CHANGEAUX, J.P. (1977) Ceruleotoxin; a possible marker of the cholinergic ionophore. Eur.J.Biochem., 74:43-51.
- BON, C.; CHANGEAUX, J.P.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H. (1979) Post-synaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. Eur.J.Biochem., 99:471-81
- BRISSON, A.; DEVAUX, P.F.; CHANGEAUX, J.P. (1975) Effects anesthésique local de plusieurs composés hiposolubles sur la réponse de l'electroplaque de Gymnote à la carbamylcholine et sur la liaison de acetylcholine au récepteur cholinergique de Torpille. C.R.Acad.Sci.Paris D, 280:2153-6.

- BÜLBRING, E. (1946) Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm on the rat. Br.J.Pharmacol., 1:38-40.
- BURGEN, A.S.V. (1982) Regulation of acetylcholine receptors. In: YOSHIDA, H.; HAGIHARA, Y.; EBASHI, S., ed. Advances in pharmacology and therapeutics. II. Neurotransmitters receptors. Tokyo, Pergamon. p.51-5.
- CASTILLO, J. del & KATZ, B. (1955) On the localization of acetylcholine receptors. J.Physiol., 128:157-81.
- CASTILLO, J. del & KATZ, B. (1957) A study of curare action with an electrical micro-method. Proc.R.Soc. London B, 146:339-56.
- CLARK, R.B. & ADAMS, P.R. (1981) Rapid flow measurements of desensitization at frog endplates. Biophys.J., 33:16A.
- COCHRANE, D.E.; WILLIAMS, F.A.; PARSONS, R.L. (1972) Activation inactivation of muscle postjunctional membrane receptors in isotonic Mg^{2+} or Ca^{2+} Ringer. Fed.Proc., 31:305.
- DURANT, N.N. & MARSHALL, I, G. (1978) The effects of 3,4-diaminopyridine on spontaneous and evoked transmitter release at the frog neuromuscular junction. J.Physiol. 280:21P.
- FASTIER, F.N. & McDOWALL, M.A. (1958) A comparison of the pharmacological properties of the three isomeric aminopyridines. Austral.J.exp.Biol., 36:365-72.
- FELTZ, A. & TRAUTMANN, A. (1980) Interaction between nerve-released acetylcholine and bath applied agonists at the frog end-plate. J.Physiol., 299:533-52.
- FELTZ, A. & TRAUTMANN, A. (1982) Desensitization at the frog neuromuscular junction; a biphasic process. J.Physiol., 322:257-72.
- GISSSEN, A.J. & NASTUK, W.L. (1966) The mechanisms underlying neuromuscular block following prolonged exposure to depolarizing agents. Ann.N.Y. Acad. Sci., 135:184-94.

- HARVEY, A.L. & MARSHALL, I.G. (1977) The facilitatory actions of aminopyridines and tetraethylammonium on neuromuscular transmission and muscle contractility in avian muscle. Naunyn-schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 299:53-60.
- HEIDMANN, J. & CHANGEAUX, J.P. (1979 a) Fast kinetic studies on the interaction of a fluorescent agonist with the membrane-bound acetylcholine receptor from Torpedo marmorata. Eur.J. Biochem., 94:255-79.
- HEIDMANN, J. & CHANGEAUX, J.P. (1979 b) Fast kinetic studies on the allosteric interaction between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites. Eur.J.Biochem., 94:281-96.
- ILLES, P. & THESLEFF, S. (1978) 4-aminopyridine and evoked transmitter release from motor nerve endings. Br.J.Pharmacol., 64: 623-9.
- JACOBS, R.S. & BURLEY, E.S. (1978) Nerve terminal facilitatory action of 4-aminopyridine; an analysis of the rising phase of endplate potential. Neuropharmacol., 17:439-44.
- KARLIN, A. (1980) Molecular properties of nicotinic acetylcholine receptors. In: COTMAN, C.W.: POSTE, G.; NICOLSON, G.L. ed. The cell surface and neuronal function. Amsterdam, North-Holland. v.6, p.223.
- KATZ, B. & THESLEFF, S. (1957) A study of the "desensitization" Produced by acetylcholine at the motor end-plate. J.Physiol., 138:63-80.
- KIM, K.C. & KARCZMAR, A.G. (1967) Adaptation of the neuromuscular junction to constant concentration of ACh. Int.J.Neuropharmacol., 6:51-61.
- KORDAS, M. (1969) The effect of membrane polarization on the time course of the end-plate current in frog sartorius muscle. J. Physiol., 204:493-502

- KORDAS, M. (1972) An attempt at an analysis of the factors determining the time course of the end-plate current. II. Temperature. J.Physiol., 224:333-48.
- LAMBERT, D.H. & PARSONS, R.L. (1970) Influence of polyvalent cations on the activation of muscle end-plate receptors. J.gen.Physiol., 56:309-21.
- LARMIE, E.T. & WEBB, G.D. (1973) Desensitization in the electrophax. J.gen.Physiol., 61:263.
- LEMEIGNANN, M. & LECHAT, P. (1967) Sur l'action anticurare des aminopyridines. C.R. Acad.Sci. Paris D, 264:169-72.
- LESTER, H.A. (1972) Vulnerability of desensitized or curare-treated acetylcholine receptors to irreversible blockade by cobra toxin. Mol.Pharmacol., 8:632-44.
- LESTER, H.A.; CHANGEAUX, J.P.; SHERIDAN, R.E. (1975) Conductance increases produced by bath application of cholinergic agonists to Electrophorus electroplaques. J.gen.Physiol., 65:797-816.
- LUNDH, H. (1978) Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. Brain Res., 153:307-18.
- LUNDH, H. & THESLEFF, S. (1977) The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals. Eur.J.Pharmacol., 42:411-2.
- LUNDH, H.; LEANDER, S.; THESLEFF, S. (1977) Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat. The effects of tetraethylammonium guanidine and 4-aminopyridine. J.Neurol.Sci., 32:29-43.
- LUNDH, H.; NILSSON, D.; ROSEN, I. (1977) 4-aminopyridine a new drug tested in the treatment of Eaton-Lambert syndrome. J.Neurosurg.Psychiatr., 40:1109-12.

- LUNDH, H.; NILSSON, O.; ROSEN, I. (1979) Effects of 4-aminopyridine in myasthenia gravis. J.Neurol.Neurosurg.Phychiatr., 42:171-5.
- MAGAZANIK, L.G., (1968) Mechanism of desensitization of the post synaptic muscle membrane. Biofizika, 13:119-203. (Em russo).
- MAGAZANIK, L.G. (1970) On the mechanism of influence of the diethylaminoethyl ether of diphenylpropylacetic-acid (SKF-525A) on the neuromuscular synapses. Bull.exp.Biol.Med. URSS, 3:10-3 (Em russo).
- MAGAZANIK, L.G. (1971) On the mechanism of anti-acetylcholine effects of some mononitrogen anti-cholinergics in the neuromuscular sinapse. Pharmacol.Toxicol., 3:292-7. (Em russo).
- MAGAZANIK, L.G. & VYSKOČIL, F. (1970) Dependence of acetylcholine desensitization on the membrane potential of frog muscle fibre and on the ionic changes in the medium J.Physiol., 210: 507-18.
- MAGAZANIK, L.G. & VYSKOČIL, F. (1972) The loci of α -bungarotoxin action on the muscle postjunctional membrane. Brain Res., 48:420-3.
- MAGAZANIK, L.G. & VYSKOČIL, F. (1973) Desensitization at the motor end-plate. In: RANG, H.P., ed. Drug receptors. London, Macmillan. p.105-19.
- MAGAZANIK, L.G. & VYSKOČIL, F. (1975) The effect of temperature on desensitization kinetics at the post-synaptic membrane of the frog muscle fibre. J.Physiol., 249:285-300.
- MAGAZANIK, L.G. & VYSKOČIL, F. (1976) Desensitization at the neuromuscular junction. In: THESLEFF, S., ed. Motor innervation of muscle. London, Academic. cap.5, p.151-76.

- MAGLEBY, K.L. & STEVENS, C.F. (1972 a) The effect of voltage on the time course of end-plate currents. J.Physiol., 223:151-71.
- MAGLEBY, K.L. & STEVENS, C.F. (1972 b) A quantitative description of end-plate currents. J.Physiol., 223:173-97.
- MANTHEY, A.A. (1966) The effect of calcium on the desensitization of membrane receptors at the neuromuscular junction. J.gen. Physiol., 49:963-76.
- MANTHEY, A.A. (1970) Further studies of the effect of calcium on the time course of action of carbamylcholine at the neuromuscular junction. J.gen.Physiol., 56:407-19.
- MANTHEY, A.A. (1972) The antagonistic effects of calcium and potassium on the time course of action of carbamylcholine at the neuromuscular junction. J.Memb. Biol., 9:319-40.
- MARLAS, G. & BON, C. (1982) Relationships between the pharmacological action of crotoxin and its phospholipase activity. Eur.J.Biochem., 125:157-65.
- MILEDI, R. & POTTER, L.T. (1971) Acetylcholine receptors in muscle fibres. Nature, 233:599-603.
- MOLGÓ, J.; LEMEIGNAN, M.; LECHAT, P. (1977) Effects of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction. J.Pharmacol.exp. Ther., 203:653-63.
- MOLGÓ, J.; LUNDH, H.; THESLEFF, S. (1980) Potency of 3,4-diaminopyridine and 4-aminopyridine on mammalian neuromuscular transmission and the effect of pH changes. Eur.J.Pharmacol., 61: 25-34.
- MOREAU, M. & CHANGEAUX, J.P. (1976) Studies on the electrogenic action of acetylcholine with Torpedo marmorata electric organ. I. Pharmacological properties of the electroplaque. J.mol. Biol., 106:457-67.

- NASTUK, W.L. (1967) Activation and inactivation of muscle postjunctional receptors. Fed.Proc., 26:1639-46.
- NASTUK, W.L. (1977) Cholinergic receptor desensitization. In: COTTRELL, G.A. & USHERWOOD, P.N.R., ed. Synapses. New York, Academic. p.177-201.
- NASTUK, W.L. & GISSEN, A.J. (1965) Actions of acetylcholine and other quaternary ammonium compounds at the muscle postjunctional membrane. In: PAUL, W.M.; DANIEL, E.E.; KAY, G.M.; MONCKTON, G., ed. Muscle. New York, Pergamon. p.389-402.
- NASTUK, W.L. & GISSEN, A.J. (1966) Action of certain quaternary ammonium compounds in neuromuscular transmission. In: RODAHL, K. & ISSEKUTZ, JR., B., ed. Nerve as a tissue. New York, Harper and Row. p.305-20.
- NASTUK, W.L. & LIU, J.H. (1966) Muscle postjunctional membrane; changes in chemosensitivity produced by calcium. Science, 154: 266-7.
- NASTUK, W.L. & PARSONS, R.L. (1970) Factors in the inactivation of postjunctional membrane receptors of frog skeletal muscle. J.gen.Physiol., 56:218-49.
- PARSONS, R.L.; JOHNSON, E.W.; LAMBERT, O.H. (1971) Effects of lanthanum and calcium chronically denervated muscle fibers. Am. J.Physiol., 220(2):401-5.
- PELHATE, M. & PICHON, Y. (1974) Selective inhibition of potassium current in the giant axon of the cockroach. J.Physiol., 242:90-1P.
- PENNEFATHER, P. & QUASTEL, D.M.J. (1982) Fast desensitization of the nicotinic receptor at the mouse neuromuscular junction. Br.J.Pharmacol., 77:395-404.
- PIEDRABUENA, A.E. (1982) Comunicação pessoal.

- RANG, H.P. & RITTER, J.M. (1970) On the mechanism of desensitization at cholinergic receptors. Mol.Pharmacol., 6:357-82.
- RUUF, R.L. (1977) A quantitative analysis of local anaesthetic alteration of miniature end-plate currents end-plate current fluctuations. J.Physiol., 264:89-124.
- SCHAUF, C.L.; COLTON, C.A.; COLTON, J.S.; DAVIS, F.A. (1976) Aminopyridine and sparteine as inhibitors of membrane potassium conductance; effects on Myxicola giant axons and the lobster neuromuscular junction. J.Pharmacol.exp.Ther., 197(2):414-25.
- SOBEK, V.; LEMEIGNAN, M.; STREICHENBERGER, G.; BENOIST, J.M.; GOGUEL, A.; LECHAT, P. (1968) Étude sur le diaphragme isolé de rat de l'antagonisme entre substances curisants et aminopyridines. Arch. int.Pharmacodyn., 171(2):356-68.
- STAMENOVIC, B.A. (1968) apud GINSBORG, B.L. & JENKINSON, O.H. (1976) Transmission of impulses from nerve to muscle. In: ZAIMIS, E., ed. Neuromuscular junction. Berlin, Springer. p.279.
- SUAREZ-KURTZ, G.; PAULO, L.G.; FONTELES, M.C. (1969) Further studies on the neuromuscular effects of β -diethylaminoethyl-diphenyl propylacetate hydrochloride (SKF-525-A) Arch. int.Pharmacodyn., 177:185-95.
- SUGIYAMA, H.; POPOT, J.L.; CHANGEAUX, J.P. (1976) Studies on the electrogenic action of acetylcholine with Torpedo marmorata electric organ. III. Pharmacological dessensitization in vitro of the receptor-rich membrane fragments by cholinergic agonists. J.mol.Biol., 106: 485-96.
- TAKEUCHI, N. (1963) Effects of calcium on the conductance change of the end-plate membrane during the action of transmitter. J.Physiol., 167:141-55.

- THESLEFF, S. (1955 a) The mode of neuromuscular block caused by acetylcholine, nicotine, decamethonium and succinylcholine. Acta Physiol.Scand., 34:218-31.
- THESLEFF, S. (1955 b) The effects of acetylcholine, decamethonium and succinylcholine on neuromuscular transmission in the rat. Acta Physiol. Scand., 34:386-92.
- TSAI, M.C.; OLIVEIRA, A.C.; ALBUQUERQUE, E.X.; ELDEFRAWI, M.E.; ELDEFRAWI, A.T. (1979) Mode of action of quinacrine on the acetylcholine receptor ionic channel complex. Mol.Pharmacol., 16:382-92.
- ULBRICHT, W. & WAGNER, H.H (1976) Block of potassium channel of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization. Pflügers Arch., 367:77-87.
- VITAL BRAZIL, O. (1966) Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. Mem.Inst.Butantan, Simp. internac., 33(3):981-92.
- VITAL BRAZIL, O. & FONTANA, M.D. (1982) Effect of 4-aminopyridine on the desensitization of the rat diaphragm caused by carbachol. In: LECHAT, P. et al. Aminopyridines and similarly acting drugs; effects on nerves, muscle and synapses . Oxford, Pergamon. p.240.
- VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D.; HELUANY, N.F. (1979 a) Mode of action of crotoxin at the guinea-pig neuromuscular junction. Toxicon, 17 (Suppl. 1):17.
- VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D.; HELUANY, N.F. (1979 b) Effect of 4-aminopyridine on the neuromuscular blockade produced by crotoxin. Toxicon, 17 (Suppl.1):16.
- VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D.; PAVANI, N.J.P. (1982) Effect of 4-aminopyridine on the end-plate receptor desensitization caused by carbachol. Eur.J.Pharmacol., 86:199-205.

- VOHRA, M.M. & PRADHAN, S.N. (1964) Pharmacology of 3,4-diamino pyridine. Arch. int. Pharmacodyn., 150:413-24.
- VOHRA, M.M.; PRADHAN, S.N.; JAIN, P.C.; CHATTERJEE, S.K.; ANAND, N. (1965) Synthesis and structure-activity relationships of some aminopyridines, imidazopyridines, and triazolopyridines. J. med. Chem., 8:296-304.
- VYSKOČIL, F. & MAGAZANIK, L.G. (1972) The desensitization of post junctional muscle membrane after intracellular application of membrane stabilizers and snake venom polypeptides. Brain Res., 48:417-9.
- YEH, J.Z.; OXFORD, G.S.; Wu, C.H.; NARAHASHI, T. (1976 a) Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. Biophys.J., 16:77-81.
- YEH, J.Z.; OXFORD, G.S.; Wu, C.H.; NARAHASHI, T. (1976 b) Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane. J.gen.Physiol., 68:519-35.