

ALBERTO PELLEGRINI FILHO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA AÇÃO DA CROTAMINA
NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

*Tese de Doutorado apresentada
à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas*

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Vital Brazil

P364C

- 1976 -

P364c

ALBERTO PELLEGRINI FILHO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA AÇÃO DA CROTAMINA
NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Tese de Doutorado apresentada
à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Vital Brazil

1976

Ao Professor Oswaldo Vital Brazil, orientador deste trabalho, a quem devo meu interesse pela pesquisa básica e cujo exemplo de honestidade científica procuro seguir,

ao Marcos Dias Fontana, Instrutor do Departamento de Farmacologia, pela valiosa e amigável colaboração em muitas experiências,

ao Dr. Nubor Orlando Facure, Coordenador do Departamento de Neurologia, pelo apoio e compreensão,

ao Prof. C.J. Laure, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo fornecimento da crotamina,

aos Assistentes dos Departamentos de Farmacologia e Neurologia, pelo incentivo,

ao Nadim F. Heluany, Chefe de Secção Técnica do Departamento de Farmacologia, pelo auxílio em várias experiências,

ã Maria Carolina dos Santos e Ruth Margelo, pela solicitude e eficiência com que realizaram o trabalho de datilografia,

ao Pedro e Leonilda Gimenez, do Serviço de Documentação Científica da UNICAMP, por grande parte das fotografias,

ao Gildo B. Leite, Maria de Jesus F. de Carvalho e Sr. José R. Bandeira, funcionários do Departamento de Farmacologia,

o meu agradecimento

Ao Professor Oswaldo F. Julião,

a minha saudade

INTRODUÇÃO

Em 1949, durante uma reunião científica no Instituto Malbrán em Buenos Aires, BARRIO e VITAL BRAZIL (1) comunicaram pela primeira vez os resultados de seus estudos com a peçonha da cascavel sulamericana Crotalus durissus terrificus. Verificaram que esta peçonha poderia ser classificada farmacologicamente em dois tipos, por eles denominados tipo I e tipo II. A injeção intraperitoneal da peçonha tipo I induzia em ratos e camundongos, numa fase inicial, crises de hipertonia e posteriormente hipotonia muscular e paralisia flácida. A peçonha tipo II produzia apenas hipotonia muscular e paralisia flácida. Em preparações neuromusculares in situ em ratos, observaram naqueles em que era injetada a peçonha tipo I que as respostas musculares aos estímulos elétricos isolados diretos ou indiretos apresentavam um relaxamento lento e parcial, seguido por uma contração secundária, além de contrações espontâneas. Estes registros miográficos, os sinais apresentados pelos animais intatos e o antagonismo verificado com a quinidina e os íons Ca^{++} e Mg^{++} levaram os autores a estabelecer uma analogia entre os efeitos musculares produzidos pela peçonha tipo I e aqueles determinados pela veratrina. Além disso, também nesta ocasião, puderam notar que, apesar de pertencerem à mesma sub-espécie, as cascavéis originárias da Argentina produziam peçonha tipo I e entre as provindas do Brasil havia as produtoras do tipo I (Paraná e noroeste de São Paulo) e do tipo II (Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e regiões sul e nordeste de São Pau-

10).

Em 1950, MOURA GONÇALVES (2) denominou crotamina uma proteína por êle isolada três anos antes através da análise eletroforética de peçonha de Crotalus durissus terrificus, provinda da Argentina (3). Neste seu trabalho de 1947, MOURA GONÇALVES havia realizado a eletroforese em Tiselius e verificado no compartimento superior do ramo descendente a existência de um componente fortemente básico a que chamou "X". Em 1950, ao denominá-lo crotamina, pode constatar sua presença na peçonha de cascavéis do sul do Brasil e Argentina, mas não nas do norte do Brasil. Nessa ocasião o autor sugeria que provavelmente a presença ou não de crotamina deviam-se as diferenças relatadas por BARRIO e VITAL BRAZIL nos efeitos farmacológicos produzidos pelas peçonhas das cascavéis da Argentina e de Goiás.

BARRIO (4), em 1954, também utilizou a análise eletroforética da peçonha de cascavel e observou que a fração I onde estava presente a crotamina, uma vez injetada em ratos, produzia os efeitos veratrínicos que anteriormente êle e VITAL BRAZIL haviam verificado com a peçonha tipo I. Ficou assim comprovado que realmente os diferentes efeitos observados com as peçonhas tipo I e tipo II eram devidos exclusivamente à presença ou não da crotamina.

Estudos posteriores de MOURA GONÇALVES (5), utilizando a ultracentrifugação, confirmaram a existência de cascavéis que apesar de pertencerem à mesma sub-espécie, distinguíam-se por secretarem ou não a crotamina. Uma vez que não há diferenças morfológicas definidas entre elas, este autor propôs que se utilizasse a distinta com

posição da peçonha como um instrumento taxionômico, a exemplo do que ocorre com outras formas de vidas inferiores como as bactérias. Sugeriu então a criação de uma sub-espécie por êle denominada Crotalus terrificus crotaminicus (6). Posteriormente, com a mudança do nome da cascavel sulamericana de Crotalus terrificus terrificus para Crotalus durissus terrificus, proposta por KLAUBER (7), o próprio MOURA GONÇALVES corrigiu a denominação de sua nova sub-espécie para Crotalus durissus crotaminicus (8). Esta nomenclatura foi criticada por BARRIO (9) que não a julga justificável, uma vez que como a crotamina, há também outros componentes que variam segundo a distribuição geográfica, o que se fosse da mesma forma levado em conta, traria grande complicação taxionômica.

SCHENBERG (10) estudou a distribuição geográfica de 530 exemplares de cascavéis e utilizou a eletroforese e ensaios farmacológicos in vivo em camundongos, denominando as serpentes crotamino-positivas e crotamino-negativas, segundo fossem produtoras ou não de crotamina. Seus achados assemelham-se àqueles já descritos por BARRIO e VITAL BRAZIL. Embora referindo a possibilidade de mosaicos geográficos, pode verificar que as serpentes provindas de Goiás, do norte e do nordeste do Brasil, sempre se mostraram crotamino-negativas, com exceção de algumas do Ceará. Todas as cascavéis da Argentina foram crotamino-positivas. No Estado de São Paulo as serpentes da região noroeste eram todas crotamino-positivas. De outras regiões do Estado provinham exemplares dos dois tipos, predominando as crotamino-negativas.

Os trabalhos posteriores de MOURA GONÇALVES (8, 11) permitiram uma melhor caracterização físi-

co-química da crotamina. Trata-se de uma toxina polipeptídica com ponto isoelétrico em pH 10,3, portanto, fortemente básica e com peso molecular de 5.000. É constituída de 46 resíduos de quinze espécies de ácidos aminados cuja sequência está em vias de determinação, tendo já sido definida 80% de sua estrutura primária (12).

Os estudos farmacológicos com peçonha total de cascavel que se seguiram ao de BARRIO e VITAL BRAZIL, confirmaram plenamente suas observações (13). Como era de se esperar, são as investigações utilizando a crotamina isolada as que têm possibilitado um melhor conhecimento de suas ações farmacológicas. Quanto à toxicidade, CHEYMOL e cols. (14), verificaram que a crotamina é 8 vezes menos tóxica que a peçonha total, o que faz supor sua pequena participação na determinação da gravidade dos acidentes produzidos pelas cascavéis. As preparações mais usadas para estudo das ações da crotamina têm sido as neuromusculares in situ ou isoladas, destacando-se os trabalhos de CHEYMOL e cols. (15, 16, 17). A injeção ou adição de crotamina produz de imediato uma contração muscular. Este efeito aparece espontaneamente ou durante a estimulação elétrica da preparação, sendo observado também em preparações curarizadas ou cronicamente desnervadas. Após a contração inicial há uma fase de diminuição da amplitude das respostas aos estímulos elétricos isolados, seguida de outra em que se verifica o aumento dessas respostas. Uma segunda dose da toxina não reproduz essa sequência de eventos, configurando-se, portanto, uma taquifilaxia que pode durar até 24 horas no camundongo. Sob a ação da crotamina pode-se também observar um retardo na descontração e/ou "after-contraction", ou seja, uma contração secundária em se

guida à resposta a um estímulo isolado ou tetanizante aplicado no nervo ou diretamente no músculo. Os autores são unânimes em identificar a natureza periférica dos efeitos musculares observados, afastando, pela sua ocorrência em preparações desnervadas, um componente neurogênico significativo. Aceita-se sua ação preponderante diretamente sobre a fibra muscular e não através dos receptores colinérgicos, pela presença dos efeitos em preparações bloqueados pela d-tubocurarina ou pelo decametônio. Outras evidências nesse sentido são o antagonismo verificado com agentes estabilizadores da membrana como os íons cálcio, magnésio e a quinidina, bem como o aumento da sensibilidade do músculo reto abdominal de rã aos íons potássio.

Novos avanços no conhecimento do mecanismo de ação da crotamina foram possíveis pela introdução da eletromiografia nas investigações por VITAL BRAZIL e cols. (18, 19). Verificaram estes autores que durante a contração inicial espontânea, o retardo na descontração e a "after-contraction", aparecem no eletromiograma descargas de potenciais de alta frequência (acima de 200-300 por seg) e pequena amplitude (50-150 μ V), com características semelhantes aos observados durante o fenômeno miotônico. Concluíram, com base em seus estudos, que a intoxicação pela crotamina deve ser classificada entre as miotonias, "não só por suas características eletromiográficas e miográficas, mas também, pelos sinais que animais íntegros não anestesiados apresentam após a administração de pequenas doses da toxina" (18).

AS MIOTONTIAS HUMANAS, ANIMAIS E
EXPERIMENTAIS

O fenômeno miotônico observado em uma série de condições patológicas humanas e de animais (miotonia congênita das cabras, cães e camundongos) apresenta caracterização clínica e eletromiográfica bem definidas. Do ponto de vista clínico a miotonia consiste em lentidão e dificuldade à descontração, que se traduz por rigidez muscular (20). Em geral, manifesta-se durante os movimentos que exigem certa força muscular, predominando no seu início e tendendo a diminuir ou desaparecer com a repetição do mesmo ("warm-up phenomenon"). A miotonia é atenuada pelo calor e se agrava com o frio, as emoções e o repouso. Eletromiograficamente caracteriza-se por descargas de potenciais de alta frequência inicial cujas variações produzem um som peculiar comparado classicamente ao de um avião de bombardeio "em picada" (21). Estes potenciais são de pequena amplitude e duração, com parâmetros análogos aos de fibrilação. Aparecem durante a dificuldade à descontração, a introdução ou mobilização de eletrodo de agulha (Fig. 1) ou a percussão do músculo, desencadeante da chamada miotonia mecânica.

As doenças humanas em que o fenômeno miotônico está presente podem ser classificadas segundo a proposta de ZELLWEGER e IONASESCU (22) em: a) Distrofia Miotônica; b) Miotonia Congênita de Thomsen; c) Miotonia generalizada de início pós-natal; d) Paramiotonia Congênita de Eulenburg; e) Paralisia Periódica Paramiotônica; f) Adinamia

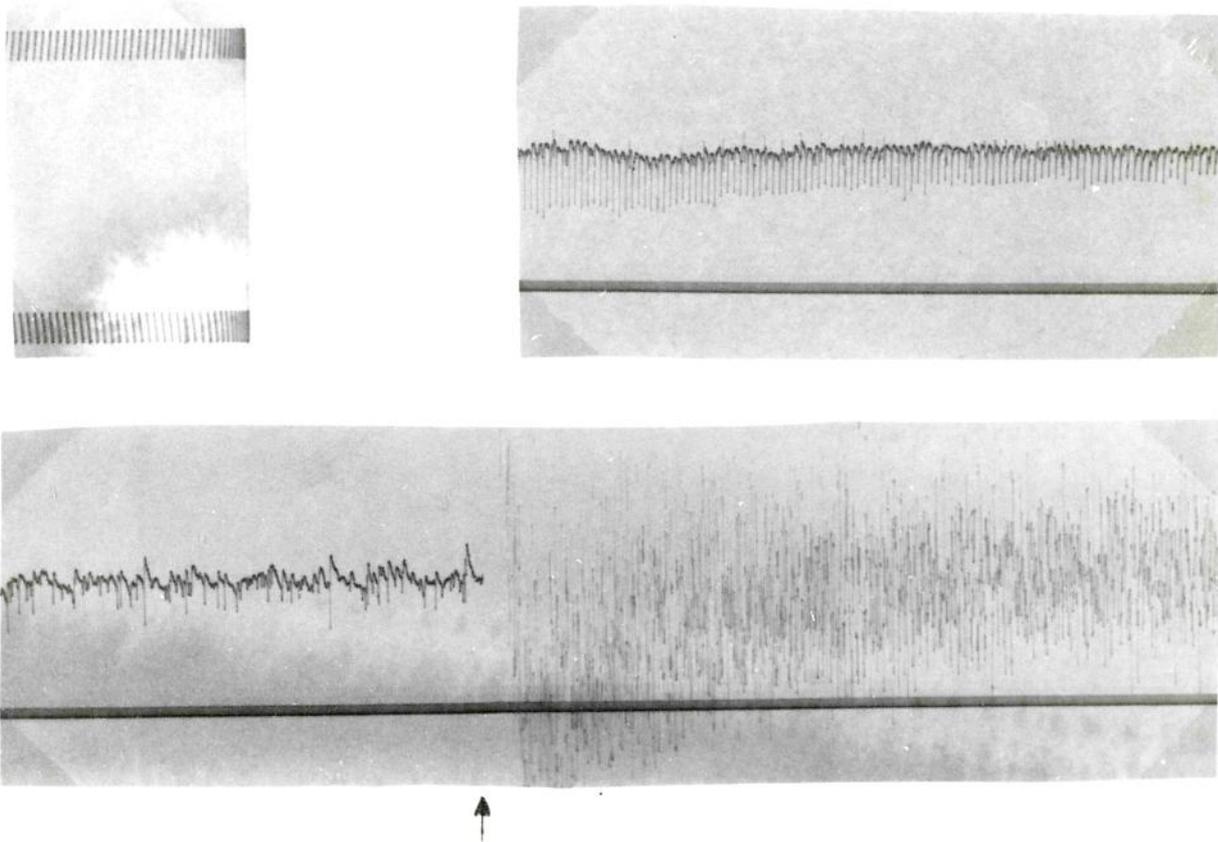


Figura 1 - Eletromiografia realizada em paciente portador de Moléstia de Steinert. No alto à esquerda - calibração para 1 mV; no alto à direita - eletromiografia do músculo tibial anterior direito em repouso. Presença de potenciais de alta frequência, monofásicos, com amplitude inicial de 200-250 μ V tendendo à diminuição (potenciais miotônicos). Velocidade 50 cm/seg. Em baixo - eletromiografia do primeiro interósseo da mão direita - presença dos potenciais miotônicos durante o repouso. A movimentação da agulha (\uparrow) desencadeia nova descarga desses potenciais. Velocidade 50 cm/seg. (EMG realizada pelo autor no Departamento de Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP).

Episódica Hereditária com Miotonia.

O diagnóstico diferencial entre elas é feito não apenas por determinadas particularidades do fenômeno miotônico de cada uma, mas também, ou principalmente, pelos outros elementos do quadro clínico. Assim, na Distrofia Miotônica ou Moléstia de Steinert, a mais frequente de todas as miotonias - 4,9 por 100.000 habitantes na Suíça (23) - de herança autossômica dominante, a miotonia é pouco marcada, limitando-se frequentemente aos músculos da mão e antebraço. A atrofia muscular, no entanto, pode ser muito pronunciada, afetando predominantemente os músculos da face, pescoço e os dos segmentos distais dos membros. Em muitos casos o miocárdio é também envolvido - alterações eletrocardiográficas em 70% dos casos (24) - o que pode levar ao óbito por insuficiência ou parada cardíaca. No quadro clínico é possível encontrar-se ainda calvície frontal, rebaixamento mental, catarata, hipogonadismo e outras alterações endócrinas, hiperostose craniana interna, manifestações digestivas e alterações das imunoglobulinas, predominantemente diminuição da IgG por aumento de seu catabolismo (22, 23, 24, 25). Na Miotonia Congênita de Thomsen, que apresenta uma forma de herança autossômica dominante e outra autossômica recessiva (Becker), o fenômeno miotônico domina o quadro clínico, é generalizado e se acompanha de hipertrofia muscular (20, 22). A Paramiotonia Congênita de Eulenburg, Paralisia Periódica Paramiônica e Adinamia Episódica Hereditária com Miotonia, todas com herança autossômica dominante, apresentam ainda problemas de caracterização nosológica. Parece haver alguma conexão entre elas (26), podendo mesmo para alguns, serem

entendidas como formas polares de uma mesma moléstia (27, 28). Em todas, a miotonia predomina na face e pescoço, atingindo também os membros distalmente. É caracteristicamente desencadeada pelo frio, melhora ou desaparece em ambiente aquecido e pode se agravar com o exercício (miotonia paradoxal). Não há atrofias ou hipertrofias musculares. Para os adversários das concepções unicistas, a diferenciação entre as três condições é possível, considerando-se que episódios paralíticos ocorrem na Paralisia Periódica Paramiotônica e na Adinamia Episódica Hereditária com miotonia, mas não na Paramiotonia Congênita de Eulenburg, após a administração de potássio. Na Paralisia Periódica Paramiotônica o frio também desencadeia tais episódios, o que não ocorre na Adinamia Episódica Hereditária com miotonia (22).

A classificação de ZELLWEGER e IONASESCU não dá conta de outras condições nosologicamente ainda não bem definidas em que a miotonia também está presente. Entre elas pode-se destacar a síndrome de ABERFELD e cols. ou miotonia condrodistrófica (29). Estão também excluídas as miotonias produzidas por drogas e, agora acertadamente, pela ausência de expressão clínica, as "miotonias eletromiográficas" que ocorrem na polimiosite ou em condições que levam à desnervação (30).

A fisiopatologia da miotonia tem sido objeto de muitas pesquisas, podendo-se identificar várias formas de abordagem do problema. Além dos estudos eletrofisiológicos, anátomo-patológicos e bioquímicos realizados em pacientes com miotonia, têm-se prestado a estas investigações as cabras congenitamente miotônicas e as miotonias produzidas por drogas.

A miotonia das cabras afeta determinada raça do sul dos Estados Unidos. Foi descrita em 1904, por WHITE e PLASKETT, e mereceu detalhado estudo clínico, anátomo-patológico e farmacológico de KOLB (31). BROWN e HARVEY (32), em 1939, com a utilização deste modelo animal realizaram estudo eletrofisiológico, verificando que o fenômeno miotônico desencadeado pela estimulação elétrica ou mecânica aparecia com suas características clínicas e eletromiográficas inalteradas na musculatura curarizada ou cronicamente desnervada. Estes autores, com base nestes achados, sugeriram que a miotonia é devida a uma anormalidade da própria fibra muscular, com exclusão de participação do sistema nervoso periférico, central ou de alterações na junção neuromuscular em sua gênese. Anteriormente, GRUND (1919) e SCHAFFER (1921) - citados por SAMAHA e cols. (33) - estudando a miotonia humana já haviam notado a persistência do fenômeno após bloqueio completo das fibras nervosas. Investigações posteriores de HOFMANN e cols. (34), com o emprego de microeletrodos intracelulares e microiontoforese de acetilcolina em preparações isoladas de músculos intercostais de pacientes de Distrofia Miotônica, confirmaram a localização do defeito ao nível da fibra muscular. Verificaram de fato que os mecanismos pré-sinápticos, os potenciais de placa terminal, a sensibilidade dos receptores à acetilcolina, o conteúdo de acetilcolinesterase e o acoplamento excitação-contração eram normais. Contudo, alguns estudos eletrofisiológicos in vivo (35, 36, 37) tendem a reconhecer um componente neurogênico na Molestia de Steinert. Foi observada em pacientes portadores desta doença uma diminuição da velocidade de condução motora e do

número de unidades motoras de um determinado músculo, com conservação de seu tamanho. Este achado corresponderia a um padrão de atrofia muscular mais caracteristicamente neurogênica no que miogênica. Estudos histopatológicos desta moléstia relatam um acometimento preferencial das fibras do tipo I (diminuição do tamanho e desigualdade no diâmetro da fibra muscular, alterações das miofibrilas, proliferação nuclear, presença de massas sarcoplasmáticas perinucleares), e relativa conservação das do tipo II (33, 38, 39). Esta limitação das alterações a um determinado tipo de fibras, costumeiramente tida como sugestiva de origem neurogênica, pode, entretanto, perfeitamente depender de uma diferente susceptibilidade das fibras musculares a um determinado agente patogênico (40). Da mesma forma, os relatos de alterações das terminações nervosas como aumento das ramificações terminais, intumescimento e irregularidade dos axônios e mielina, redução do calibre ou ruptura das fibras nervosas e placas motoras anormalmente grandes ou pequenas, embora sugiram um acometimento nervoso primário, podem decorrer das alterações das fibras musculares (41). Alguns autores, apesar de reconhecerem a evidência eletrofisiológica do envolvimento dos nervos periféricos na Moléstia de Steinert, não conseguiram estabelecer correlação entre este comprometimento e as alterações musculares (42). Assim, enquanto em alguns pacientes pequena atrofia muscular era acompanhada por importantes sinais de neuropatia periférica, em outros, com grandes atrofias e diminuição da força muscular, não havia indícios de acometimento nervoso. Com base nestes dados, os autores acreditam que os nervos e músculos são afetados independentemente pelo gen

pleiotrópico responsável pela doença. Parece-nos também importante salientar que os componentes distrófico e miotônico da Moléstia de Steinert não apresentam necessariamente a mesma origem, sendo portanto perfeitamente válido admitir-se que a eventual existência de uma participação neurogênica no processo distrófico não implica aceitá-la como diretamente envolvida na gênese do fenômeno miotônico (33, 43, 44). Quanto a este, pelas evidências já apontadas anteriormente, tudo parece indicar que o distúrbio causador reside ao nível da fibra muscular.

Duas possibilidades então se apresentam: ou o defeito está relacionado a fenômenos de membrana, ou a alteração nos mecanismos de contração e relaxamento. Mais especificamente nesta última hipótese haveria ou uma tendência anormal da actina e da miosina de manterem suas pontes de ligação, resultando numa contração prolongada, ou um decréscimo na captação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático, resultando num relaxamento prolongado (45).

A primeira alternativa deve ser a mais provável. Com efeito, o fenômeno miotônico implica não apenas em determinada manifestação clínica, mas também em descarga eletromiográfica peculiar. Pela inexistência de substrato eletromiográfico não são, por exemplo, classificadas entre as miotonias, a contratura muscular induzida pelo exercício (em que há comprovadamente diminuição da capacidade do retículo sarcoplasmático em captar os íons cálcio) (46), nem o lento relaxamento dos reflexos tendinosos observado no hipotiroidismo (28). Por apresentar alterações eletromiográficas distintas das encontradas na miotonia, apesar da seme-

lhança clínica, é também excluída a chamada Neuromiotonia ou Pseudomiotonia. Nesta condição, que pode ser uma manifestação paraneoplásica (47), predominam descargas de potenciais poli-fásicos de pequenas unidades motoras e parece haver comprovadamente um fator neurogênico em sua origem (48, 49). Uma vez que anomalias do mecanismo de contração - relaxamento não explicam os característicos potenciais miotônicos, pois eles não ocorrem nas condições em que elas existem (50), a miotonia deve depender primariamente de alterações da membrana das fibras musculares. Além disso, em todas as fibras musculares, na Miotonia Congênita e nas não distróficas na Moléstia de Steinert, o comprimento dos sarcomeros, o tamanho, número e arranjo dos filamentos de actinia e miosina, bem como as linhas Z, são normais (33). Com relação à captação do cálcio radiativo na fração microsômica de homogenato muscular, a atividade na Miotonia Congênita e Miotonia das cabras é igual ao controle normal (33, 51). A captação nos primeiros minutos de incubação pode ser maior (33) ou menor (51) que o controle nos casos de Steinert, o que provavelmente está relacionado à predominância ou não de fibras tipo I, as afetadas pelo processo distrófico, mas a atividade total é normal. Como se sabe, as fibras tipo I, também chamadas vermelhas ou tônicas, responsáveis por contrações mantidas, apresentam um retículo sarcoplasmático pouco desenvolvido em relação às do tipo II, brancas ou fásicas, responsáveis por contrações rápidas. Se em uma fase da doença as fibras tipo I, apesar de serem preferencialmente atingidas, predominarem sobre o tipo II, a captação inicial será menor. O inverso ocorre quando as do tipo II forem em maior número. O que merece ser ressaltado novamente é

que apesar do processo distrófico poder atingir 3/4 das fibras, fato evidenciado pela presença de massas sarcoplasmáticas, a fração do retículo sarcoplasmático mantém sua atividade bioquímica total in vitro dentro da normalidade (33).

Ao que tudo indica, portanto, a miotonia deve ser o resultado de uma alteração da membrana da fibra muscular que a torna instável, ou seja, anormalmente sensível a estímulos elétricos, químicos ou mecânicos (52). NORRIS (53) estudou os potenciais de membrana através de microeletrodos inseridos no músculo tibial anterior de pacientes portadores de Miotonia Congênita e Paramiotonia. Pode observar que de forma espontânea ou desencadeada pela introdução do eletrodo iniciava-se uma lenta despolarização da membrana. Quando atingia 20-40 mV, ocorria um potencial de ação, o qual era seguido por nova despolarização lenta, tendo-se como resultado final uma descarga iterativa de potenciais de ação.

Vários autores têm procurado determinar a origem destas descargas iterativas assíncronas das fibras musculares. CREUTZFELD e cols. (54) procuraram estudar in vivo o potencial de membrana de repouso das fibras musculares com a mesma técnica utilizada por NORRIS, em paciente com Adinamia Episódica Hereditária (ou Paralisia Periódica Hipercalemica), durante os ataques paralíticos e nos períodos intercríticos. Nestes, o potencial de repouso era de $-68,5 \pm 5,9$ mV, significativamente menor que o controle normal. Durante as crises os potenciais eram de $-46,3 \pm 6,6$ mV (com um potássio plasmático de 6,9 mEq/l) e $-51,5 \pm 6,3$ mV (com um potássio plasmático de 5,24 mEq/l). Segundo esses au

tores o baixo potencial de membrana observado durante as crises ou no intervalo entre elas não pode ser unicamente explicado em termos de concentração em íons potássio. Esta afirmação é feita com base em cálculos a partir da equação de Nernst. Se apenas o potássio estivesse implicado, sua concentração intracelular, que é normalmente de 150 mEq/l, deveria cair para 51 mEq/l nos intervalos ou 41-38 mEq/l durante as crises. Várias determinações revelam valores normais para o potássio intracelular nos intervalos das crises. Se a despolarização se devesse apenas a um aumento do potássio extracelular, seus níveis deveriam ser muito mais elevados do que os observados. É proposto então um possível aumento da permeabilidade ao íon Na^+ , mesmo no intervalo das crises, o que explicaria os dados obtidos. Este aumento da permeabilidade ao sódio resultaria num sistema instável. Durante o ataque paralítico o aumento do nível sanguíneo de potássio provocaria uma maior queda do potencial de membrana, o que induziria novo aumento na permeabilidade ao sódio e, conseqüentemente, maior despolarização. Esta seqüência de eventos tenderia a possibilitar a deflagração do potencial de ação e assim poderia explicar a descarga miotônica observada no início do ataque paralítico. Também segundo esses autores, o fato de um ataque ser rapidamente interrompido pela injeção venosa de cálcio, apoiaria a hipótese do envolvimento do sódio.

HOFMANN e cols. (34) determinaram o potencial de membrana de repouso em 8 pacientes com Distrofia Miotônica e constataram uma diminuição nítida ($-62,1 \pm 4,5$ mV) em relação ao contróle ($-78,8 \pm 2,5$ mV). Em duas crianças com miotonia desde logo após o nascimento, os valores

foram ainda menores ($-58,4 \pm 6,3$ mV e $-42 \pm 9,8$ mV). Para esses autores, a despolarização seria uma anormalidade fundamental na miotonia, a base para a atividade iterativa. Também admitem, a partir de cálculos, que o sódio deve estar implicado, seja por um distúrbio do mecanismo de transporte para o exterior da fibra, seja por um aumento da permeabilidade a este íon. Neste último caso, consideram hipoteticamente a possibilidade do aumento da permeabilidade ser secundário a modificações na estrutura da membrana com alteração nas ligações dos íons cálcio. MUNSAT (52), igualmente, salienta a importância da despolarização, lembrando que as drogas com atividade despolarizante como a acetilcolina, neostigmina e potássio, intensificam a miotonia. Por outro lado, aquelas que estabilizam a membrana, impedindo a despolarização, como a quinina, o cálcio e a procaína, melhoram o estado miotônico. Para este autor, o benefício experimentado pelos pacientes miotônicos (Miotonia Distrófica e Miotonia Congênita) com o uso da difenilhidantoína poderia estar relacionado à ação desta droga na facilitação do mecanismo de extrusão do sódio (ativação da bomba de sódio), o que levaria a uma estabilização da membrana.

Alguns autores, entretanto, não consideram a despolarização como fundamental na gênese do fenômeno miotônico (55). Acreditam que na Moléstia de Steinert ela deva estar relacionada às alterações distróficas, uma vez que foi observada também na Distrofia Muscular Progressiva forma de Duchenne. Admitem também não haver proximidade entre o potencial de membrana de repouso e o potencial de membrana crítico (ou limiar de excitabilidade). Através de seus

estudos in vivo em pacientes com Distrofia Miotônica, verificaram que a redução do potencial de repouso era compensada por uma correspondente queda no potencial de membrana crítico (ou aumento no limiar de excitabilidade), mantendo-se, portanto, normal o valor de despolarização da membrana necessário para o desencadeamento do potencial de ação.

Com a utilização de preparações isoladas de músculo intercostal externo de pacientes portadores de Miotonia Congênita (56, 57) e de cabras miotônicas (58) não foi constatada uma diminuição do potencial de repouso, antes pelo contrário, uma tendência à hiperpolarização. Nestas duas patologias foi verificado um aumento da resistência da membrana. Empregando solução nutritiva com baixo cloro os autores puderam observar que este aumento se deve a uma diminuição da condutância ao Cl^- (g_{Cl}). A g_{Cl} em fibras normais durante o repouso é responsável por cerca de 70% da condutância total da membrana. Foi também notado um aumento da condutância ao potássio, o que deve explicar o fato das fibras normais despolarizarem e as miotônicas hiperpolarizarem em meio com baixo cloro. Na Distrofia Miotônica essas alterações não estão presentes, sendo a resistência da membrana normal (57).

RUDEL e SENEGES (59), utilizando o diafragma isolado de rato, produziram miotonia pela substituição do cloro da solução nutritiva por um anion não difusível. Observaram que o músculo nestas condições responde a um único estímulo com contração prolongada e que o eletromiograma revela durante a mesma, atividade iterativa das fibras musculares. O fenômeno denominado "warm-up" é também observado

neste modelo, pois o aumento da frequência da estimulação elétrica diminui o tempo de contração e a atividade iterativa no eletromiograma. Esta observação indica que a origem do "warm-up" não está em eventual aumento da g_{Cl} após uma sequência de contrações. O potencial de repouso cai logo após a substituição do cloro e começa a oscilar, muitas vezes sem ultrapassar o limiar de excitabilidade. O potencial de ação apresenta-se com maior duração às custas de uma repolarização mais lenta. A reposição do cloro extracelular faz com que a contração e o eletromiograma readquiram suas características normais. A corrente de cloro para o interior da membrana é fundamental na fase de repolarização lenta, durante o pós-potencial negativo. É ela a responsável pela repolarização da membrana até que seja atingido o valor do potencial de repouso, quando a condutância ao potássio já se tornou inativa. Segundo esses autores, sua ausência poderia determinar a descarga repetitiva miotônica.

Estudo recente (60) mostra que a diminuição da g_{Cl} isoladamente explica a descarga iterativa de potenciais de ação observada na miotonia. O autor utilizou um modelo matemático preciso do sarcolema de rã e, através da simulação por computador de uma redução isolada da g_{Cl} , viu ser possível reproduzir a miotonia. Promovendo uma redução progressiva da g_{Cl} observou inicialmente apenas um prolongamento da fase de repolarização lenta do potencial de ação. Ao atingir a g_{Cl} níveis mais baixos (cerca de 30% do normal) aparece um segundo potencial de ação. Uma vez iniciada por um único estímulo a atividade iterativa se auto-mantém indicando que um estado semelhante à miotonia pode ser produ

zido numa membrana teórica, simplesmente pela redução da g_{Cl} aos níveis descritos em pacientes e cabras miotônicas. A produção de um segundo potencial de ação requer uma corrente de sódio para o interior da membrana em algum momento após o primeiro potencial de ação que exceda a corrente de potássio para o exterior. Qualquer fator que aumente a corrente de sódio residual durante a repolarização pode levar a membrana a esta condição. O autor verificou que a alteração da repolarização provocada por uma diminuição da g_{Cl} a níveis suficientes, resulta numa inversão da corrente total da membrana durante a fase terminal da repolarização, o que possibilita um segundo potencial de ação. De acordo com este autor, a procaina e a difenilhidantoína, reduzindo o influxo de sódio durante a fase de recuperação do potencial de ação, compensam a diminuição da corrente aniônica resultante da diminuição da g_{Cl} e suprimem a miotonia.

As miotonias produzidas por drogas têm se revelado valioso instrumento para o estudo da fisiopatologia do fenômeno miotônico. Possibilitam a obtenção de modelos experimentais que muito se assemelham à miotonia observada em patologia humana ou animal.

O ácido 2,4-diclorfenoxiacético (2,4-D) foi introduzido, em 1944, na agricultura como herbicida. Seu efeito tóxico para as plantas é devido a uma excessiva estimulação do crescimento. Embora inicialmente fosse tido como inofensivo a animais, em 1946, BUCHER - citado por EYZAGUIRRE e cols. (61) - descreveu alguns efeitos em mamíferos. Notou o desenvolvimento de rigidez muscular, semelhante à miotonia, confirmada com estudo miográfico e eletromiográ-

fico. EYZAGUIRRE e cols. (61) injetaram em ratos esta substância por via intraperitoneal e arterial. Utilizaram preparações neuromusculares in situ com registro miográfico e eletromiográfico, constatando aumento na amplitude e duração das respostas aos estímulos elétricos isolados. No eletromiograma observaram descargas iterativas, acentuadas pelo potássio e acetilcolina e antagonizadas pela estimulação repetida, a quinina, o cálcio e o magnésio. Os efeitos se mantinham sem alterações à estimulação mecânica ou elétrica direta no músculo curarizado. Concluíram esses autores que o fenômeno observado com o 2,4-D era indistinguível da miotonia humana e das cabras, assemelhando-se também aos efeitos da veratrina. SENGES e RUDEL (62,63), com a utilização do diafragma isolado de rato também produziram miotonia pela adição de 2,5 mM de 2,4-D à solução nutritiva. Observaram as alterações miográficas e eletromiográficas já descritas. Com microtécnicas verificaram um aumento de 2 a 2,5 vezes na resistência da membrana. O potencial de repouso e o limiar de excitabilidade permaneceram normais. Os autores sugerem a possibilidade do aumento da resistência da membrana ser devido à diminuição da g_{Cl} .

BRYANT e MORALES-AGUILERA (58) estudaram outros ácidos aromáticos monocarboxílicos e verificaram que estes compostos injetados via venosa em cabras produziam sintomas semelhantes aos observados na miotonia congênita desses animais. Utilizando fragmentos isolados de músculo intercostal externo, verificaram uma diminuição da condutância da membrana e conservação do potencial de repouso. Em solução nutritiva com baixo cloro, constataram aumento da con-

dução à condutância ao potássio concluindo que estes compostos bloqueiam a condutância ao cloro, fato por eles também verificado na Miotonia Congênita humana e das cabras. Os autores encontraram tal semelhança entre a miotonia congênita das cabras e a induzida pelos ácidos monocarboxílicos que sugerem a possibilidade da presença anormal de um composto similar na etiologia desta doença.

BRODY (50) observou que o 2,4-D e outro ácido aromático monocarboxílico, o 3-cloro-2,5,8-trimetilbenzoico, aumentam a atividade da p-nitrofenil-fosfatase potássio independente (p-NPPase básica) em microsomas isolados do músculo esquelético de rato. Segundo este autor, embora não esteja completamente provado que este enzima regula o fluxo de potássio para o exterior, o aumento de sua atividade poderia explicar o aumento da condutância ao potássio observado na Miotonia Congênita humana, das cabras e a induzida pelos ácidos aromáticos monocarboxílicos. Se não houvesse um aumento do fluxo de potássio, a diminuição da condutância ao cloro, descrita nestas condições, levaria a uma diminuição do potencial de repouso, o que nelas não é observado. O autor chega a admitir que o aumento da condutância ao potássio pode ser o efeito primário dos ácidos monocarboxílicos. A tendência ao aumento do potencial de membrana por ele provocada ocasionaria uma diminuição compensatória da condutância ao cloro, o que restabeleceria o potencial de membrana, porém, produziria a miotonia.

WINER e cols. (64) observaram o desenvolvimento de espasmos musculares em 30 de 41 pacientes tratados com o agente hipocolesterolemizante 20,25-diazocoles

terol. Estes espasmos não eram dolorosos, melhoravam com o exercício e pioravam com o frio. Um dos pacientes queixou-se de grande dificuldade para abrir a mão após fechá-la e intensa fraqueza muscular. Em 28 pacientes foi feita a eletromiografia que em 27 revelou à percussão ou após a contração voluntária uma descarga de potenciais com o característico som de "vão em picada". Não havia sinais de neuropatia ou miopatia. A dose utilizada por estes pacientes variou de 25 mg , duas vezes por semana, até 50 mg por dia, via oral, por um período de até 21 meses. Dois meses após a suspensão da droga em todos os pacientes houve recuperação total. Os mesmos autores injetaram o diazocolesterol por via intramuscular em cabras normais, miotônicas e heterozigóticas sem sintomas miotônicos. Após 3 semanas de injeções diárias de 25 mg, nas cabras normais e heterozigóticas foi observada descarga miotônica ao eletromiograma, desencadeada pela percussão do músculo. Clinicamente não foi constatada a miotonia. As cabras miotônicas pioraram em muito sua condição clínica, havendo também uma maior duração das descargas iterativas. Através da análise cromatográfica, nos pacientes e cabras tratados com a droga, foi observada uma queda nos níveis plasmáticos dos esteroides totais e o aparecimento do desmosterol, o precursor imediato do colesterol, no plasma, na membrana dos eritrócitos e no músculo. SOMERS e WINER (65) acreditam que somente a baixa do colesterol e a acumulação do desmosterol não deve ser responsabilizada pela miotonia. O Triparanol, composto não esteroide, também inibe a conversão do desmosterol em colesterol, porém não produz miotonia em ratos. Agentes hipocolesterolemiantes que bloqueiam a síntese do ácido

mevalônico não aumentam o nível plasmático do desmosterol e igualmente não produzem miotonia. Por outro lado, uma ação miotóxica direta do diazocolesterol independente das alterações na síntese de esteróides também não parece ser a causa pois a miotonia por ele induzida em ratos pode ser prevenida por dieta rica em colesterol. A indução de miotonia em ratas exige uma administração mais prolongada do diazocolesterol do que em ratos, o que pode estar relacionado ao fato do colesterol plasmático ser mais alto nas fêmeas do que nos machos (66). Dada a importância do colesterol na estrutura da membrana, os autores concluem que o diazocolesterol deve produzir seus efeitos alterando o tipo ou quantidade dos esteróides do sarcolema. WAKAMATSU e cols. (67), partindo da constatação de que o Tripáranol embora não induzindo miotonia produz catarata e calvície, sinais encontrados na Distrofia Miotônica, procuraram estudar os níveis plasmáticos de vários lipídeos nesta condição. Observaram aumento do desmosterol, colesterol e dos triglicérides, alterações que embora distintas das produzidas pelo diazocolesterol, levaram-nos a considerar a possibilidade de uma aberração hereditária do metabolismo lipídico na Moléstia de Steinert. Na Miotonia Congênita de Thomsen não constataram essas alterações. RUDEL e SENGES (63) produziram miotonia em ratos alimentando-os, por 2 a 4 meses, com uma dieta de 10 mg por dia de 20,25-diazocolesterol. Os sintomas miotônicos foram nítidos e o eletromiograma revelou as características descargas desta condição. Determinando os parâmetros da membrana do diafragma isolado desses ratos, observaram que o potencial de repouso estava entre -65 e -80 mV, não diferindo significativamente do

controle. A resistência da membrana encontrada era o dobro do normal. Posteriormente (60), utilizando solução nutritiva com baixo cloro, puderam verificar que o aumento da resistência da membrana devia-se a uma baixa da condutância ao cloro, mantendo-se normal a condutância ao potássio. CACCIA (68), procurando produzir miotonia em ratos com o diazocolesterol, verificou que a mesma não aparece quando o músculo é previamente desnervado. A desnervação 5 a 10 dias após o início da miotonia não afeta a atividade miotônica já induzida. A cordotomia, mas não a rizotomia posterior, também previne o aparecimento desta condição. Os autores concluem que a técnica por eles utilizada não permite entender completamente os dados encontrados. Sugerem que estudos intracelulares e ultra-estruturais, bem como bioquímicos que procurem verificar as relações entre a ação do diazocolesterol e os fenômenos neurosecretórios centrais poderão elucidar as ligações entre os mecanismos neurogênicos e esta miotonia experimental.

FULLER e cols. (69) descreveram a miotonia produzida pelo ácido indol-acético. Poucos minutos após a injeção intraperitoneal em camundongos, verificaram que os animais ao tentar se mover mantinham as patas traseiras estendidas e rígidas, num espasmo tônico que impedia a marcha. Em preparações neuromusculares observaram um aumento da amplitude e duração das respostas à estimulação direta e indireta. Não foi, entretanto, realizado estudo eletromiográfico, de forma que a caracterização do fenômeno como miotonia requer confirmação. Com esta condição, o ácido indol-acético seria o primeiro composto fisiologicamente encontrado no organismo a ser identificado como capaz de produzir mioto

nia.

Entre as miotonias produzidas por drogas, aquela há mais tempo conhecida é a determinada pelos alcalóides do veratrum. KRAYER e ACHESON (70), numa extensa revisão, descreveram os efeitos produzidos pela veratrina no músculo esquelético de rã. O músculo em repouso tratado com uma dose apropriada da droga não demonstra nenhuma anormalidade. Se entretanto, um breve estímulo lhe é aplicado ou ao nervo correspondente, a rápida contração usual é seguida por um relaxamento lento que pode durar mais de 20 segundos. Em seguida, pode ocorrer espontaneamente nova contração secundária, tanto maior quanto maior for a dose empregada. A preparação curarizada ou desnervada responde à estimulação direta com as mesmas características. O eletromiograma durante o relaxamento lento e a contração secundária revela descargas iterativas de potenciais de ação, afastando a possibilidade de tratar-se de uma contratura e caracterizando o fenômeno como miotônico. Soluções altamente concentradas de veratrina produzem um encurtamento mantido do músculo, mesmo sem o estímulo externo. O cálcio e a quinina antagonizam estes efeitos. O potencial de ação apresenta-se alterado, com um aumento de pós-potencial negativo, prolongando o período de excitabilidade supernormal. É seguido por descargas de novos potenciais, configurando a resposta iterativa. FRANK (71) utilizou o sartório isolado de rã procurando estudar através de microtécnicas os parâmetros da membrana. Em repouso notou uma diminuição da resistência da membrana. Em altas concentrações verificou que a veratrina determina uma grande queda do potencial de repouso. Comprovou o aumento do pós-potenci-

al negativo, durante o qual também há um decréscimo da resistência da membrana. Segundo este autor, o fato de o potencial de membrana ser reduzido durante o pós-potencial negativo sob a veratrina, enquanto a condutividade da membrana está apenas discretamente aumentada, sugere que este decréscimo do potencial deve ser devido a um aumento na permeabilidade ao sódio. Se a redução do potencial de membrana fosse devida à acumulação de íons K^+ na superfície externa da mesma, o aumento da condutividade deveria ser muito maior que o observado. A redução da concentração de sódio no meio nutritivo elimina completamente o aumento da duração do pós-potencial negativo. Estes dados sugerem fortemente que a veratrina determina um aumento da condutividade ao sódio em seguida ao potencial de ação, o que deve estar relacionado com as descargas iterativas observadas.

Em conclusão, após esta resumida revisão das miotonias humanas, animais e experimentais, parece lícito admitir-se que a miotonia, fenômeno precisamente definido clínica e eletromiograficamente, apresenta substratos fisiopatológicos distintos nas várias condições em que ocorre. Assim, parece haver uma aproximação entre as miotonias da Moléstia de Steinert, da Adinamia Episódica Hereditária e da veratrina, nas quais o mecanismo fundamental seria uma alteração da permeabilidade da membrana da fibra muscular ao sódio. Por outro lado, os fenômenos miotônicos da Miotonia de Thomsen, da miotonia das cabras e os determinados pelos ácidos monocarboxílicos e pelo diazocolesterol, também teriam um mecanismo comum, qual seja, um aumento da resistência da membrana por uma diminuição da condutância ao cloro.

OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo , contribuir para o conhecimento da ação da crotamina no músculo esquelético. Esperou-se alcançá-lo através da introdução de técnicas ainda não utilizadas no estudo das ações farmacológicas desta toxina, tais como sua injeção em cabras intatas, a realização de eletromiografia nestes animais e em preparações neuromusculares isoladas, assim como a determinação dos potenciais de repouso e potenciais de placa terminal em miniatura com a utilização de microeletrodos intracelulares.

Não há, na verdade, um interesse médico imediato no conhecimento mais preciso das ações desta toxina, uma vez que ela tem responsabilidade nula na determinação da gravidade dos acidentes crotálicos. Entretanto, seus curiosos e complexos efeitos no músculo esquelético necessitam ser mais conhecidos, pois, provavelmente, trata-se de uma toxina que pode ser utilizada como um instrumento farmacológico de pesquisa. Segundo ZLOTKIN (72) a toxinologia atual ultrapassa o interesse estritamente médico, podendo as toxinas se constituírem em instrumentos para o estudo de fenômenos fisiológicos essenciais, fontes potenciais de novos agentes terapêuticos e elementos de estudo de relações zoológicas e de taxionomia de animais peçonhentos. Como exemplo temos a enorme importância do descobrimento do mecanismo de ação da alfa-bungarotoxina, neurotoxina do elapídeo asiático Bungarus multicinctus. Sua propriedade de se combinar ,

do forma irreversível, com os receptores colinérgicos da junção neuromuscular, tem permitido o aprofundamento do estudo destes receptores e, por conseguinte, do mecanismo de transmissão neuromuscular (73). A tetrodotoxina com sua propriedade de bloquear seletivamente a permeabilidade ao sódio nas membranas excitáveis é outro exemplo a ser citado (74).

É necessário conhecer melhor as características da miotonia induzida pela crotamina. Podemos estar diante de mais um modelo experimental desta condição, o que contribuiria para o esclarecimento de seus mecanismos fisiopatológicos. Nenhuma das substâncias até agora conhecidas como indutoras de miotonia é de natureza proteica. A crotamina seria a primeira a ser identificada como tal. Além disso, assim como para a Miastenia Gravis parece estar estabelecida a presença de um fator humoral em sua etiologia (75, 76), esta possibilidade tem sido proposta por alguns autores também para a miotonia humana, o que aumentaria o interesse por uma proteína capaz de produzi-la. HARPER e DYKEN (77) observaram que de 40 casos de Moléstia de Steinert com início antes dos 5 anos, dos quais conheciam-se os pais em 35, 34 deles tinham a mãe afetada e apenas 1 o pai. Afastada a possibilidade de fertilidade diferente entre os sexos e a existência de um gen distinto para esta forma da moléstia, os autores sugerem que algum fator no ambiente intrauterino poderia estar agindo no sentido de provocar o início precoce da doença em indivíduos portadores do gen para Distrofia Miotônica. KRULL e cols. (78), em paciente portador de Adinamia Episódica Hereditária com miotonia, aplicou um garrote no braço a fim de produzir uma oclusão isquêmica e venosa. Con-

trações repetidas da mão por 15 minutos foram seguidas por importante miotonia generalizada após a retirada do garrote. Sem as contrações a liberação do garrote não era seguida de miotonia. O nível sérico de potássio no membro não garroteado permaneceu constante. Retirado sangue da veia cubital do membro comprimido e estocado a 4°C, após 8 horas sua injeção venosa no paciente provocou miotonia. O potássio sérico não estava elevado no sangue estocado, nem no soro do paciente durante a miotonia. Este mesmo sangue estocado produziu o fenômeno miotônico comprovado clínica e eletromiograficamente quando injetado por via venosa em ratos e coelhos. Os autores concluem que a atividade muscular neste paciente libera uma substância diferente do potássio que produz miotonia generalizada e pode ser estocada a 4°C por pelo menos 8 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados quatro grupos de experiências:

1. Experiências em cabras

Em seis experiências estudaram-se os efeitos da injeção intramuscular de crotamina em cabras. Foram utilizados dois animais do sexo feminino, pesando 7,5 kg e 8,5 kg, sendo cada um submetido a três experiências com intervalo mínimo de 8 dias.

Em quatro experiências foi realizado o estudo eletromiográfico. Captaram-se os potenciais bioelétricos musculares através de eletrodo de agulha coaxial. Após passarem por um pré-amplificador Tektronix, tipo 122, foram conduzidos a osciloscópio Tektronix, tipo 502-A e registrados fotograficamente através de câmera fotográfica Tektronix C-12, acoplada ao osciloscópio. Em uma experiência utilizou-se eletromiógrafo clínico marca Alvar, modelo MYODYNE IIS, equipado com alto-falante, o que possibilitou a conversão sonora dos potenciais

Os animais eram injetados com crotamina na dose de 1 mg/kg de peso e logo submetidos à observação, registrando-se fotograficamente os efeitos produzidos.

Em seguida, eram colocados em gaiola de Faraday montada sobre uma mesa onde permaneciam em decúbito lateral, procedendo-se então à eletromiografia (EMG) com inserção da agulha nos músculos proximais das patas posteriores. Registravam-se os potenciais musculares espontâneos e aqueles produzidos pela introdução e movimentação da agulha. Não foi feito o estudo dos potenciais evocados mediante estimulação elétrica. Em uma experiência também foi feita EMG previamente à injeção de crotamina. Em outra, durante os efeitos de sua administração, o animal foi anestesiado pela injeção venosa de pentobarbital sódico (Nembutal) na dose de 15 mg/kg de peso, para se obter abolição da motilidade voluntária. Em duas experiências, foi realizada a injeção venosa de solução de cloreto de cálcio a 10% na dose de 0,25 e 0,50 ml/kg de peso. Em uma experiência a de solução de sulfato de quinidina a 0,1% em soro fisiológico na dose de 10 ml/kg de peso. Estas substâncias foram injetadas com a finalidade de observar seus efeitos sobre as manifestações decorrentes da administração de crotamina.

2. Preparação neuromuscular em ratos

Realizaram-se três experiências em pregando-se ratos brancos do sexo masculino, com 250 a 300 g. Foi utilizada a preparação ciático-gastrocnêmio in situ mediante o seguinte procedimento: os ratos eram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/kg de peso por via in-

traperitoneal. Em seguida, praticava-se o isolamento do tendão gastrocnêmio de uma das patas (convenientemente fixada), que uma vez seccionado era unido através de um fio a transdutor miográfico isométrico E&M para microdeslocamento, modelo "linear-core" F-50. Deste, os sinais eram conduzidos a um dos 4 canais do fisiógrafo E&M da Narco Bio-Systems, modelo FOUR-A.

Canulava-se a veia dorsal do pênis com uma sonda plástica fina para permitir a injeção venosa de drogas. O nervo ciático era exposto ao nível da região glútea, procedendo-se a sua ligadura e secção. A porção distal era colocada em eletrodo bipolar de platina a fim de realizar-se a excitação indireta do músculo. Para tal, utilizavam-se pulsos retangulares fornecidos por estimulador eletrônico de fabricação Grass, modelo S4. Fazia-se a estimulação do nervo com estímulos supramaximais de 0,2 msec de duração, na frequência de 0,1 Hz. Para a estimulação tetanizante utilizou-se a frequência de 50 Hz durante 10 segundos. Não se realizou a estimulação direta do músculo.

Nas três experiências foi feito também estudo eletromiográfico do músculo gastrocnêmio, captando-se os potenciais bioelétricos através de inserção de agulha coaxial no interior da massa muscular. A aparelhagem utilizada já foi descrita anteriormente. Além disso, os sinais fornecidos pelo transdutor miográfico foram também conduzidos ao osciloscópio, em seu canal inferior, possibilitando registros concomitantes mecânico e elétrico do encurtamento do músculo.

Realizaram-se a estimulação e os registros de forma contínua. Após um período controle, os animais eram injetados, por via venosa, com crotamina na dose de 300-500 mcg/kg de peso.

3. Preparação neuromuscular isolada: nervo frênico-diafragma de rato

Foram realizadas dezessete experiências com esta preparação.

Utilizaram-se ratos brancos de 250-300 g de peso. A técnica empregada foi a descrita por BULBRING (79). Os animais eram anestesiados pelo hidrato de cloral (240 mg/kg, por via intraperitoneal) e sangrados por secção dos vasos do pescoço. A seguir, procedia-se a retirada do hemidiafragma esquerdo com um segmento do nervo frênico correspondente. O músculo, de forma triangular, era fixado por sua base em um suporte apropriado, sendo o vértice unido por um fio a uma alavanca isotônica cardíaca leve, munida de pena inscritora, através da qual as contrações eram registradas em um quimógrafo. Mantinha-se a preparação mergulhada em cuba com 40 ml de solução nutritiva. Em três experiências utilizou-se a solução de Tyrode com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,6; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 1; NaH₂PO₄ 0,41; NaHCO₃ 11,9; glicose 11,1. Nas experiências restantes utilizou-se a solução proposta por BRETAG, a partir de seus estudos sobre o meio extracelular dos ratos (80), com a seguinte

composição em mM: NaCl 107,7; KCl 3,48; CaCl₂ 1,53; MgSO₄ 0,69; NaHCO₃ 26,2; NaH₂PO₄ 1,67; gluconato de sódio 9,64; glucose 5,55; sacarose 7,6. A oxigenação era feita pelo borbulhamento de carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) no banho. Nas três experiências em que se utilizou a solução de Tyrode manteve-se a temperatura do banho em 36-37°C, sendo as demais, realizadas à temperatura ambiente.

A estimulação elétrica indireta do diafragma foi realizada colocando-se o nervo frênico em eletrodos de platina, mantidos imediatamente acima do nível do banho. Utilizaram-se pulsos retangulares supramaximais com duração de 0,2 msec e frequência de 0,1 Hz fornecidos por um estimulador eletrônico de fabricação Grass, modelo S4. A contração tetânica era obtida com a frequência de 50 Hz durante 10 seg. Para a estimulação direta do diafragma foram utilizados pulsos retangulares de 100 Volts, 2 msec de duração e com frequência de 0,1 Hz.

Em doze experiências, além do registro mecânico das contrações, foi realizada concomitantemente a eletromiografia. Os potenciais eram captados através de eletrodos de agulha coaxial inserida no músculo, utilizando-se a aparelhagem já descrita.

As experiências foram realizadas procurando-se, de início, estabelecer um registro miográfico e eletromiográfico controle das respostas musculares à excitação indireta com estímulos isolados e de frequência tetanizante. Posteriormente, adicionava-se a crotamina ao banho,

utilizando-se, em duas das três experiências feitas a 36-37^o C, a dose de 5 mcg/ml e na terceira, 10 mcg/ml. Nas demais, realizadas à temperatura ambiente, foi utilizada a dose de 15 mcg/ml. A crotamina era em geral adicionada sem interrupção da estimulação elétrica. Em apenas duas experiências ela foi interrompida minutos antes de juntar-se a toxina e somente reiniciada minutos após, a fim de se observar e registrar eventual contração espontânea. A intervalos de tempos variáveis após a adição da crotamina procedia-se a estimulação tetanizante. Em duas experiências juntou-se ao banho nova dose de toxina cerca de uma hora após a primeira, a fim de se verificar a existência ou não de taquifilaxia.

Procurou-se pesquisar os efeitos de algumas substâncias sobre as manifestações determinadas pela crotamina. Assim, em duas experiências, após o registro controle, adicionou-se d-tubocurarina ao banho na dose de 10 mcg/ml. Instalado o bloqueio total da preparação e mantendo-se a estimulação indireta, foi adicionada a crotamina na dose de 15 mcg/ml. Em uma preparação curarizada, fez-se a estimulação direta do músculo e durante a mesma adicionou-se a crotamina na dose de 5 mcg/ml, mantendo-se a temperatura do banho a 37^oC. Em quatro experiências procurou-se verificar os efeitos da quinidina adicionada ao banho 30 minutos antes da crotamina (15 mcg/ml). Utilizou-se a dose de 10 mcg/ml em duas preparações e 20 mcg/ml nas outras duas. O efeito do íon cálcio foi estudado reunindo-se ao banho, previamente aos 15 mcg/ml de crotamina, 1,1 ml de uma solução a 1% de cloreto de cálcio. Em uma experiência foram investigados os

efeitos da crotamina adicionada a uma preparação cuja solução nutritiva continha baixo sódio. Para isto, fez-se o registro miográfico controle das respostas à estimulação indireta utilizando-se, à temperatura ambiente, a solução nutritiva de Krebs-Ringer com a seguinte composição em mM: NaCl 135; KCl 5; MgCl₂ 2; NaHCO₃ 15; Na₂HPO₄ 1; glucose 11. Após o registro controle a solução nutritiva foi trocada por outra em que se procurou excluir o íon sódio. Substituiu-se o NaCl por sacarose numa correspondência isomolar, removeu-se o NaHCO₃ e Na₂HPO₄ e adicionou-se 4 mM de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), titulando-se para pH 7,2 com solução de HCl 5N (81). Manteve-se a estimulação elétrica até o desaparecimento das respostas, quando então juntou-se a crotamina (15 mcg/ml). Três minutos após, adicionou-se KCl (1,25 mcg/ml).

4. Diafragma de rato. Estudo do potencial de membrana e dos potenciais de placa terminal em miniatura com o emprego de microeletrodo intracelular

Foram realizadas neste grupo vinte e cinco experiências.

Utilizaram-se ratos brancos de 250-300 g, cujo hemidiafragma esquerdo foi retirado com um segmento do nervo frênico correspondente segundo técnica já descrita. O músculo era estendido e fixado com alfinetes apropriados com sua face torácica voltada para cima no fundo de

uma cuba de perspex com 10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 2 cm de profundidade. A cuba era preenchida com 30 ml da solução nutritiva proposta por BRETAG, sendo feita a oxigenação da preparação pelo borbulhamento de carbogênio. O banho foi mantido à temperatura ambiente.

Os potenciais de fibras musculares isoladas eram captados através de microeletrodo (Me) de vidro preenchido com solução de KCl 3M. Os Mes apresentavam resistência compreendida entre 5-25 M Ω . Eram preparados semanalmente no próprio laboratório e conservados em geladeira. Para sua confecção utilizavam-se túbulos de vidro apropriado e um "Microelectrode Puller" CFP, modelo 8104.

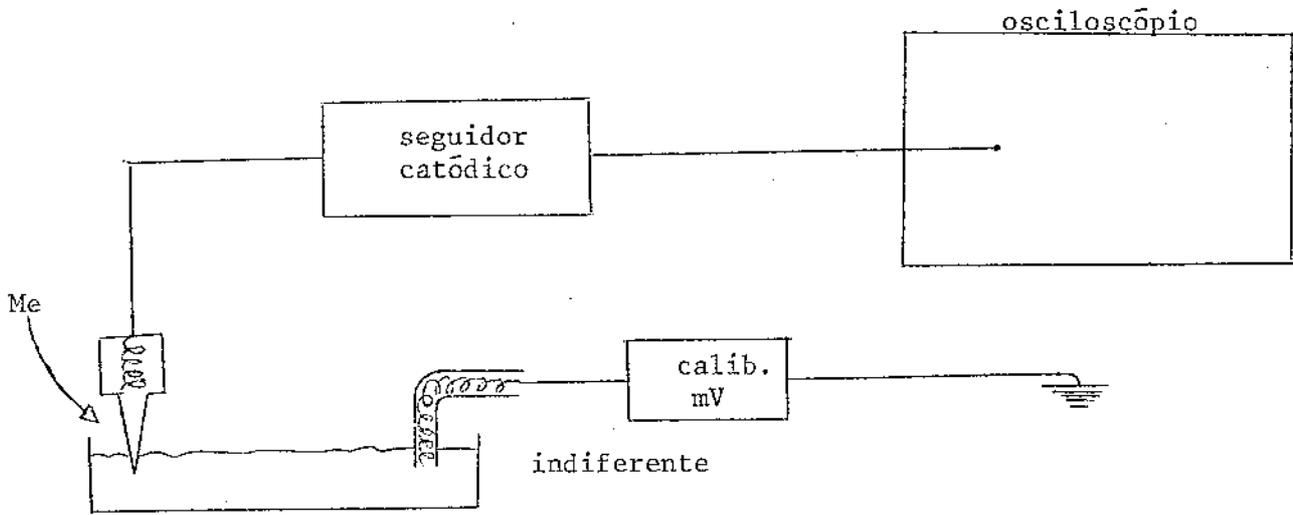
Descrição sumária do circuito:

O Me entrava em contato por sua extremidade posterior com filamento em espiral de prata cloretada contido no interior de pequeno tubo de vidro (2 cm de comprimento) preenchido com ágar. Encaixava-se em uma das extremidades desse tubo, saindo pela outra, um fio condutor que unia o filamento de prata a um seguidor catódico. O pequeno tubo de vidro era sustentado pelo braço de um micromanipulador Jena acoplado a um microscópio Zeiss para aumentos de até 40 x. Este equipamento permitia realizar pequenos deslocamentos verticais ou horizontais microscopicamente controlados do Me. O seguidor catódico estava posicionado próximo ao braço do micromanipulador e conectava-se aos dois canais de um osciloscópio Tektronix, modelo 502-A. O eletrodo indifferente, constituído por um fio espiralado de prata cloretada contido em um tubo de vidro curvo preenchido com ágar, manti

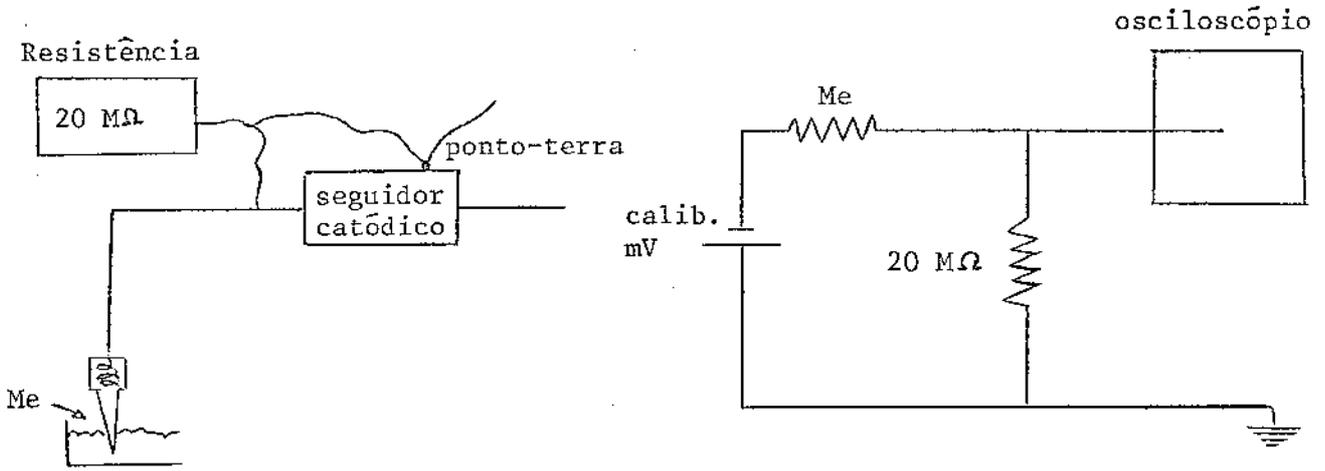
nha-se mergulhado no líquido nutritivo. Estava ligado por meio de um fio condutor a um gerador de impulsos capaz de fornecer sinais de 100, 20, 5, 1 e 0,2 mV. A preparação e toda a aparelhagem empregada, exceto o osciloscópio, permaneciam no interior de uma gaiola de Faraday montada sobre uma mesa rígida de cimento fixada ao solo a fim de evitar vibrações. O circuito descrito está esquematizado de forma simplificada na Fig. 2A. No artigo de EXCELL (82) encontram-se maiores detalhes sobre as características dos aparelhos utilizados.

Procedimento:

Após ser retirado de seu suporte de estocagem, o Me era encaixado no pequeno tubo de vidro que continha o filamento de prata cloretada. Fixava-se o conjunto no braço do micromanipulador, ligando-se o fio condutor ao seguidor catódico. Procedia-se então à medida da resistência do Me mergulhando-o na solução nutritiva e introduzindo em paralelo no circuito uma resistência de valor conhecido (20 $M\Omega$) (Fig. 2B, 2C). Eram desprezados aqueles cujas resistências não estavam compreendidas entre 5-25 $M\Omega$. A determinação do potencial de membrana (PM) das fibras musculares era feita da seguinte maneira: sob controle microscópico, inseria-se o Me no interior de uma fibra muscular e media-se o deslocamento vertical sofrido pelo canal superior dos osciloscópio no momento de penetração. Repetia-se o mesmo procedimento em dez fibras distintas em períodos de tempo não superior a um minuto e calculava-se a média aritmética das dez leituras realizadas. O PM era determinado multiplicando-se o valor da média por um fator de correção. Este era estabelecido



A - Circuito Simplificado



B - Obtenção da Resistência do Me

C - Circuito para Medida da Resistência do Me

introduzindo-se no circuito um sinal de 100 mV e medindo-se a deflexão correspondente no osciloscópio.

Em três experiências fizeram-se de terminações periódicas do PM sem adição de nenhuma droga a fim de se verificar por quanto tempo seu valor permanecia es tável nas condições em que eram mantidas as preparações.

Em dez experiências verificou-se o efeito da adição de crotamina sobre o PM. Utilizaram-se as doses de 5 mcg/ml em três experiências, 15 mcg/ml em quatro e 30 mcg/ml nas três restantes. Logo após a determinação con trole do PM juntava-se a toxina, medindo-se o potencial após 30 seg, 10 min, 30 mim e 1h e 30 min.

Procurou-se estudar o efeito da adição prévia de algumas substâncias sobre as eventuais alte rações do PM determinadas pela crotamina na dose de 15 mcg/ml. Assim, em duas experiências a quinidina na dose de 20 mcg/ml foi juntada ao banho 30 minutos antes da crotamina. Em uma experiência foi adicionada d-tubocurarina na dose de 10 mcg/ml e somente 1 hora após, quando se verificou o bloqueio com pleto da preparação pela não resposta à estimulação elétrica indireta, procedeu-se à adição da toxina. Em duas experiências utilizou-se a tetrodotoxina (TTX) na dose de 0,2 mcg/ml. Quando a preparação não mais respondia à estimulação indireta, juntou-se a crotamina. Em duas experiências utilizou-se a solução com baixo sódio, cuja composição já foi relacionada. Media-se o PM em solução de Krebs-Ringer e, posteriormente, em solução com baixo sódio, adicionando-se a crotamina

30 minutos após a troca de solução para observar, nestas condições, seu efeito sobre o PM. Em uma das duas experiências com baixo sódio, 7 minutos após a crotamina, adicionou-se o KCl (1,25 mcg/ml).

Em três experiências procurou-se observar os efeitos da crotamina (7,5 mcg/ml) sobre a amplitude e frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (MEPP). Eram eles captados inserindo-se o Me em uma fibra muscular ao nível da placa motora. Definiam-se seus parâmetros controle antes da adição da toxina pela média aritmética de três leituras de 3 minutos de duração com intervalo de 10 min entre elas. Após a crotamina, faziam-se leituras aos 30 seg e a cada 15 min com um período total de observação de 2 horas. Em uma experiência pretendeu-se verificar os efeitos da adição prévia de TTX (0,2 mcg/ml) nas eventuais alterações da amplitude e frequência dos MEPP determinados pela crotamina (7,5 mcg/ml).

- Crotamina

A crotamina utilizada na presente pesquisa foi obtida e cedida pelo Prof. C.J. Laure do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A seguir, transcrevemos a descrição do método de preparo da toxina, fornecida pelo Prof. Laure:

"A peçonha de Crotalus durissus terrificus crotamino-positiva é colhida sob gelo e cristali-

zada sob vácuo em dissecador contendo hidróxido de sódio a 2°C. Uma vez obtidos os cristais (cerca de 24 horas) são eles tratados com solução de ácido acético 0,1 M. A seguir, centrifuga-se a suspensão a 15.000 rpm. Toma-se o sobrenadante límpido e abaixa-se o seu pH com ácido fórmico 0,1 M até pH 3,5. Caso surja precipitado, o mesmo é novamente centrifugado e desprezado. A amostra é então (400 mg de peçonha bruta inicial) colocada numa coluna de Sephadex G-75, 4 x 50 cm equilibrada com tampão formiato de amônia 0,05 M, pH 3,5 e eluída com o mesmo. Volumes de 5 ml cada 10 minutos são recolhidos em coletor de frações e sua absorção medida em 280 mμ em espectrofotômetro Zeiss. Quatro ou cinco picos são obtidos dependendo da origem das peçonhas. O componente de número 4 corresponde ao "pool" de crotamina. O mesmo é separado, liofilizado e recromatografado na mesma coluna como anteriormente. Leituras espectrofotométricas são feitas em 280 mμ, separando contaminantes de outros picos. O pico principal é concentrado através de liofilização. A seguir, tudo é dializado a 4°C contra água destilada. Testes na água de diálise do íon amônio são feitos com reagente de Nessler, até serem absolutamente negativos. Uma vez negativo o teste de Nessler, a amostra é liofilizada e guardada ao abrigo da luz."

- Drogas e Reagentes utilizados

As drogas e reagentes utilizados na presente pesquisa foram os seguintes:

- Pentobarbital sódico ("Nembutal") - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., SP.
 - Hidrato de cloral - Pantofarma Ltda., SP.
 - Sulfato de quinidina - Fluka AG Chemische Fabrik, Suíça.
 - d-Tubocurarina - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., SP.
 - Tetrodotoxina - Sigma Chemical Company, EUA.
-
- Cloreto de cálcio, PA - J.T. Baker, EUA.
 - Cloreto de sódio, PA - E. Merck AG, Darmstadt, Alemanha.
 - Cloreto de potássio, PA - J.T. Baker, EUA.
 - Cloreto de magnésio, PA - Carlo Erba, Itália.
 - Fosfato monobásico de sódio, PA - J.T. Baker, EUA.
 - Fosfato dibásico de sódio, PA - Carlo Erba, Itália.
 - Sulfato de magnésio, PA - E. Merck AG, Darmstadt, Alemanha.
 - Bicarbonato de sódio, PA - Carlo Erba, Itália.
 - Gluconato de sódio - Sigma Chemical Company, EUA.
 - Glicose, PA - Quimibras Indústrias Químicas Ltda., Rio de Janeiro.
 - Sacarose, PS - Quimibras Indústrias Químicas Ltda., Rio de Janeiro.
 - Tris(hidroximetil)aminometano - E. Merck AG, Darmstadt, Alemanha.
 - Ácido clorídrico - KIKION Indústrias Químicas, SP.

RESULTADOS

1. Experiências em cabras

Num período variável de 4 a 25 minutos após a injeção intramuscular de crotamina apareciam os primeiros sinais de intoxicação. O animal começava a apresentar andar instável, tendendo a alargar sua base de sustentação, observando-se frequentes quedas. Poucos minutos após, apareciam crises de hipertonia nos músculos extensores, principalmente das patas posteriores. Estas crises surgiam espontaneamente ou quando o animal iniciava a marcha. Atingiam ora um membro, que ao se manter em extensão agravava acentuadamente a dificuldade à marcha (Fig. 3A), ora os quatro membros, o que em geral determinava a queda do animal. Uma vez no solo ali permanecia por alguns segundos com os membros e o pescoço em extensão (Fig. 3B). As tentativas de levantar-se frequentemente desencadeavam novas crises hipertônicas. Quando novamente sobre suas patas, persistia a instabilidade da marcha, à qual frequentemente se superajuntavam novas crises. Através da percussão da musculatura não foi possível desencadear fenômeno miotônico visível. Não se observou em nenhum momento dificuldade respiratória, perda de consciência ou distúrbios autonômicos. A sintomatologia descrita repetiu-se de modo uniforme em todas as experiências realizadas. Cerca de 2 horas após a injeção de crotamina o quadro tendia a regressar totalmente, desaparecendo em primeiro lugar as crises de



Figura 3A - Cabra injetada com crotamina. Notar hipertonia em extensão de uma das patas posteriores.



Figura 3B - Cabra injetada com crotamina. Animal caído ao solo com crise de hipertonia em extensão do pescoço e das quatro patas.

100 μ V
10 msec

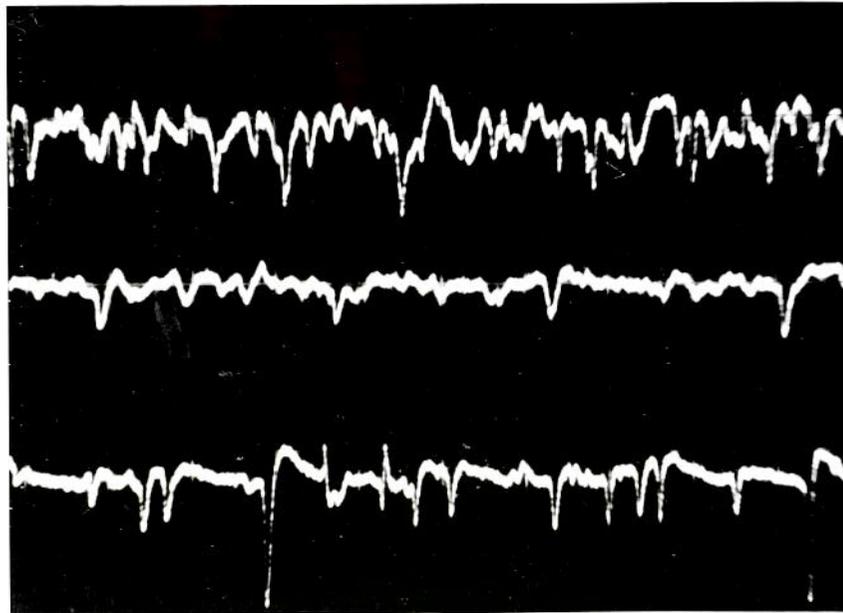


Figura 3C - EMG do quadríceps femoral de cabra injetada com crotamina. Animal anestesiado. Potenciais espontâneos uni ou di-fásicos de pequena amplitude e duração desencadeados pela inserção do eletrodo de agulha. Foto tirada durante fase de decréscimo da frequência.

hipertonia e posteriormente a instabilidade da marcha. Em uma das experiências, quando não mais ocorriam as crises, porém persistia a dificuldade de locomoção, foi injetada por via venosa solução de cloreto de cálcio a 10% e observou-se de imediato regressão total e definitiva da sintomatologia. Em outra experiência, a injeção de quinidina nesta mesma fase não alterou o quadro.

O estudo eletromiográfico destes animais revelou, logo após a inserção da agulha, descargas de potenciais mono ou difásicos de pequena amplitude (50-150 μ V), curta duração (1-2 mseg) e de frequência muito alta no início, com tendência à diminuição progressiva. A movimentação da agulha desencadeava novas descargas destes potenciais. Na experiência em que foi possível sua conversão sonora, pode-se ouvir o ruído de "vão em picada" idêntico ao produzido pelos potenciais miotônicos observados em patologia humana. A EMG realizada antes da injeção de crotamina não revelou a presença destes potenciais. Em animal anestesiado a EMG foi semelhante à já descrita (Fig. 3C). Em uma experiência a injeção venosa de solução a 10% de cloreto de cálcio determinou uma nítida diminuição da duração das descargas obtidas pela movimentação da agulha.

2. Preparação neuromuscular em ratos

Em todas as experiências, cerca de

10 a 20 seg após a administração venosa de crotamina, observou-se uma contração muscular espontânea rapidamente progressiva, atingindo em 10 a 15 seg um limite máximo de encurtamento. A amplitude desta contração inicial mostrou-se proporcional à dose de crotamina empregada, sendo maior quando se utilizou 500 mcg/kg. Após uma estabilização de 30 a 40 seg, o músculo começava a se relaxar, voltando a seu estado inicial em cerca de 70 a 90 seg. Durante a fase de encurtamento a amplitude das respostas aos estímulos isolados diminuía progressivamente, chegando a desaparecer totalmente nas experiências em que se utilizou 500 mcg/kg (Fig. 4). Com o relaxamento do músculo, estas respostas retornavam e sua amplitude crescia gradativamente. Ao se restabelecer a linha de base, eram por vezes cerca de 8 a 10% maiores que o controle e assim permaneciam por 5 a 7 minutos, quando reassumiam seu tamanho inicial. Esta fase de aumento na amplitude das respostas aos estímulos isolados, ultrapassando o tamanho controle, foi mais nítida quando se utilizaram doses menores, de 300 mcg/kg (Fig. 5). A intervalos de tempo variáveis e aparentemente sem fatores desencadeantes, esta sequência de eventos podia repetir-se de forma completa ou não, mais frequentemente quando se utilizavam doses maiores. Por vezes, observava-se transitoriamente uma dificuldade à descontração após a resposta a um estímulo isolado (Fig. 6A). A estimulação indireta com estímulos tetanizantes provocava uma contração tetânica normal, porém, às vezes, seguida de contração espontânea com início durante a fase de relaxamento do tétano denominada "after-contraction" (Fig. 6B). Este fenômeno, também podia ser observado em seguida à resposta a um estímulo isolado (Fig. 6,

Figura 4 - Preparação neuromuscular in vivo: ciático-gastrocnêmio de rato. Injeção venosa de 500 mcg/kg de peso de crotamina. Em cima - registro miográfico em fisiógrafo: respostas musculares à estimulação elétrica indireta antes e depois da injeção da toxina. Estímulos elétricos supramaximais com frequência de 0,1 Hz. "Marker" 5 seg. Fotos 1 a 4 (obtidas nos instantes assinalados) - canal superior: eletromiografia. Sensibilidade 50 uV/cm; velocidade 1 cm/10 mseg. Canal inferior: registro miográfico das respostas a estímulos isolados. Nas fotos 2 e 3 há desaparecimento dessas respostas. Em 4, pouco após o retorno à linha de base, elas apresentam amplitude e duração discretamente maiores que o controle.

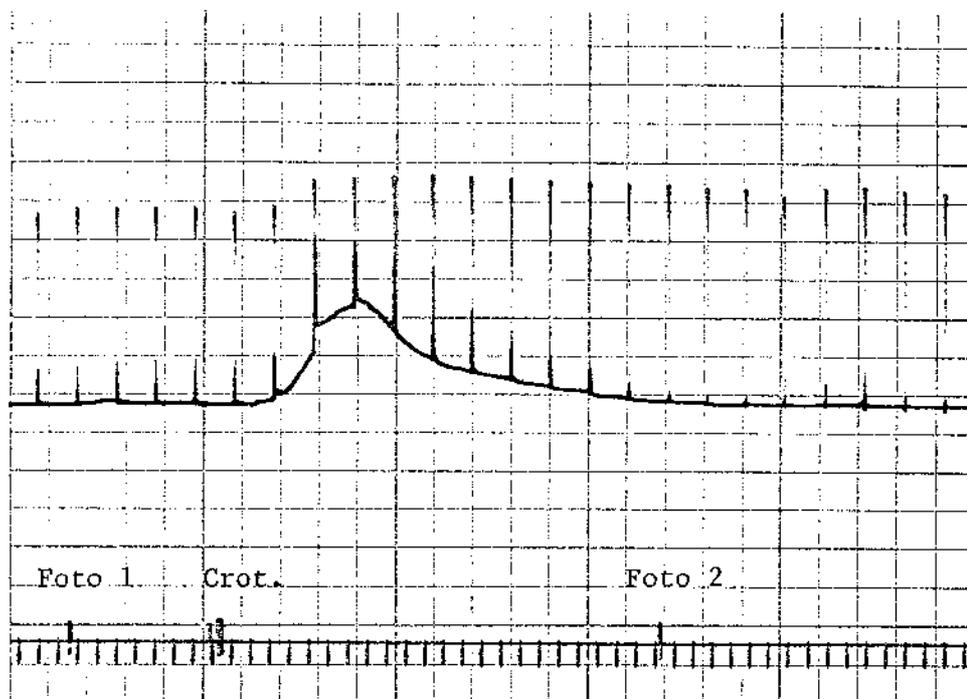


Foto 1

Foto 2

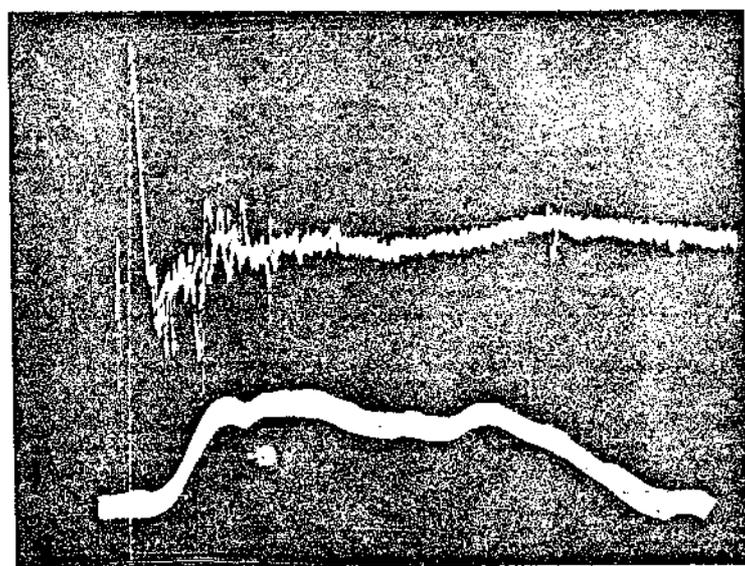
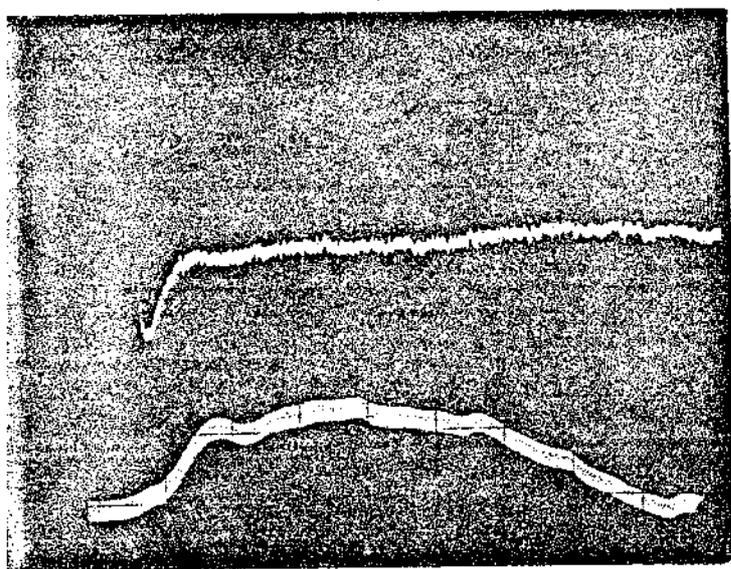


Figura 5 - Preparação neuromuscular ciático-gastrocnêmio de rato. Injeção venosa de 300 mcg/kg de peso de crotamina. Em cima - registro em fisiógrafo das respostas musculares à injeção da toxina, mantendo-se constante a estimulação elétrica supramaximal com frequência de 0,1 Hz. Notar a contração inicial menor que a verificada com 500 mcg/kg, o não desaparecimento das respostas a estímulos isolados e o aumento de sua amplitude ao retornar à linha de base. "Marker" 5 seg. Fotos 1 e 2 - canal superior: EMG controle e logo após retorno à linha de base. Na foto 2, verifica-se descarga de pequenos potenciais em seguida ao potencial de unidade motora somatório. Sensibilidade 50 μ V/cm; velocidade 1 cm/5 msec. Canal inferior: registro miográfico das respostas musculares aos estímulos isolados.

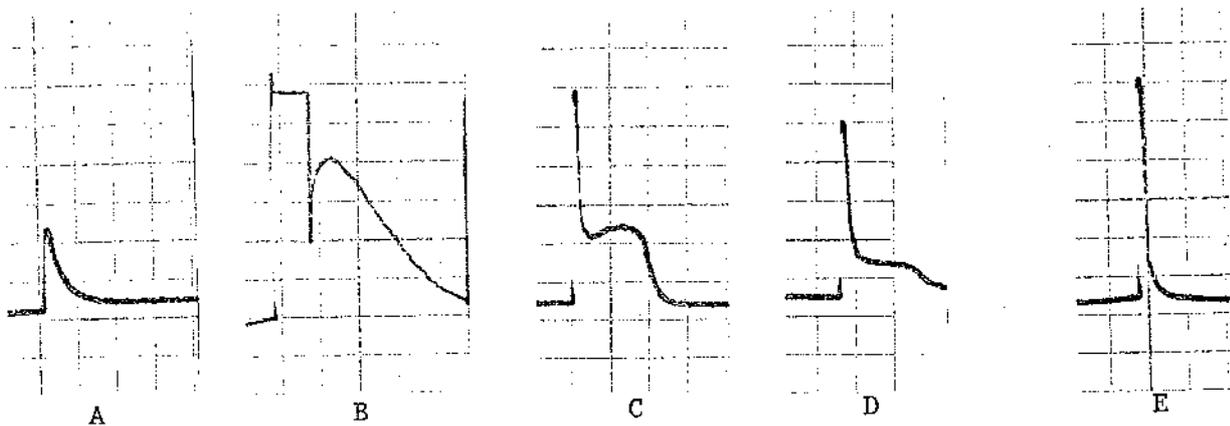


Figura 6 - Preparação neuromuscular in vivo: ciático-gastrocnêmio de rato. Cerca de 1 hora após injeção venosa de crotamina (300 mcg/kg). Velocidade 1 cm/20 seg. Em A - resposta muscular ao estímulo elétrico isolado observando-se dificuldade à descontração; em B - contração tetânica seguida de "after-contraction" iniciada durante a fase de relaxamento ; em C - mesmo fenômeno após resposta a estímulo elétrico isolado; em D - cerca de 40 seg após C , tendência ao desaparecimento da "after-contraction"; em E - alguns minutos após C e D, resposta normal ao estímulo isolado.

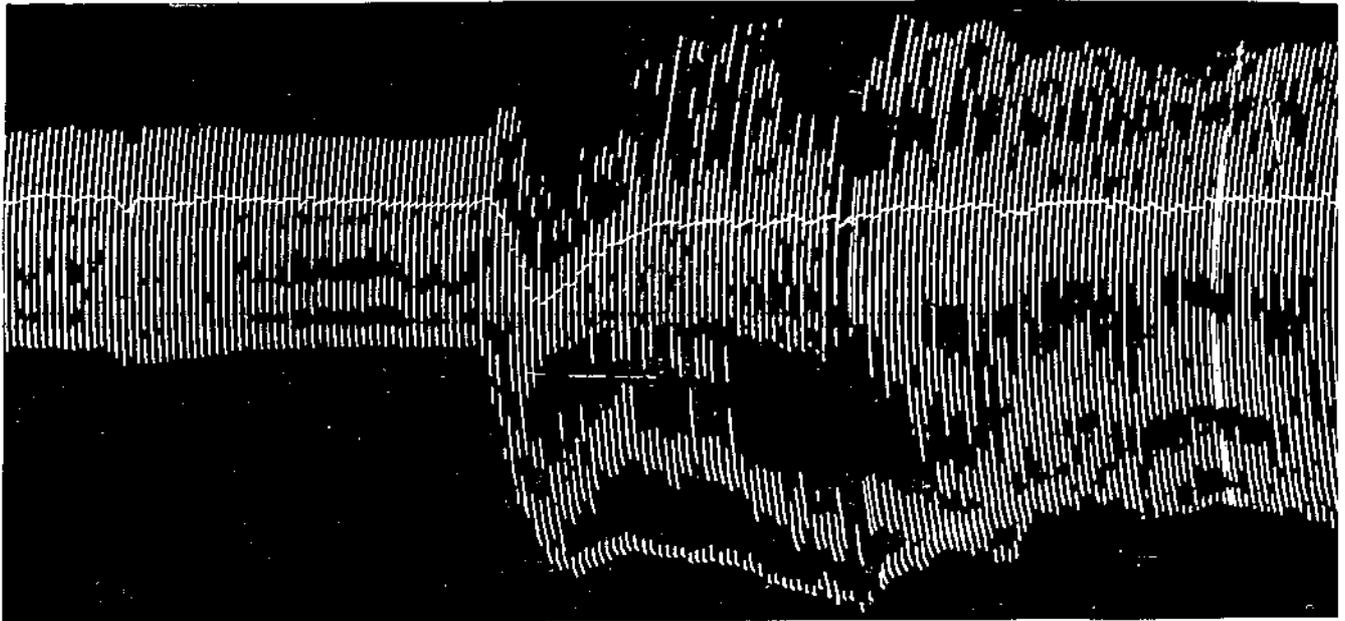
C, D, E). Nova injeção de crotamina na mesma dose, cerca de uma hora após a primeira, não determinava nenhum tipo de resposta muscular, configurando-se, portanto, uma taquifilaxia.

O estudo eletromiográfico revelou em todas as experiências, logo após a injeção venosa de crotamina, durante a fase de encurtamento do músculo, o aparecimento de potenciais de pequena amplitude (50-150 μ V) e alta frequência inicial com tendência a diminuir à medida que o músculo se relaxava. Logo após se restabelecer a linha de base, ainda era possível observar-se em seguida ao potencial de unidade motora somatório, descarga de pequenos potenciais (Figs. 4 e 5).

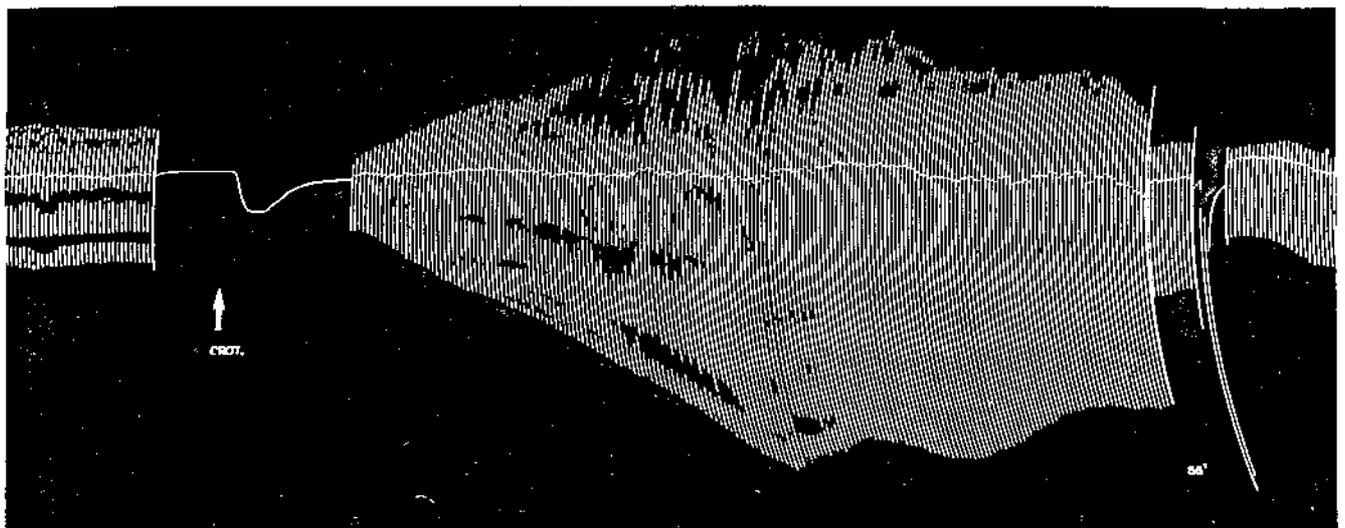
3. Preparação neuromuscular isolada nervo frênico-diafragma de rato

Nas duas experiências em que se utilizou a dose de 5 mcg/ml de crotamina, mantendo-se a temperatura do banho em solução de Tyrode a 36-37°C, observou-se, imediatamente após a adição da toxina, uma contração do músculo cujo tempo de duração compreendido desde seu início até o retorno à linha de base foi de 5 minutos. As respostas aos estímulos isolados mostraram um aumento gradativo de sua amplitude acompanhando a contração muscular, atingindo, quando do retorno à linha de base, cerca de 2-2,5 vezes seu tamanho inicial (Fig. 7A). Este se restabelecia após aproximadamente 60 minutos.

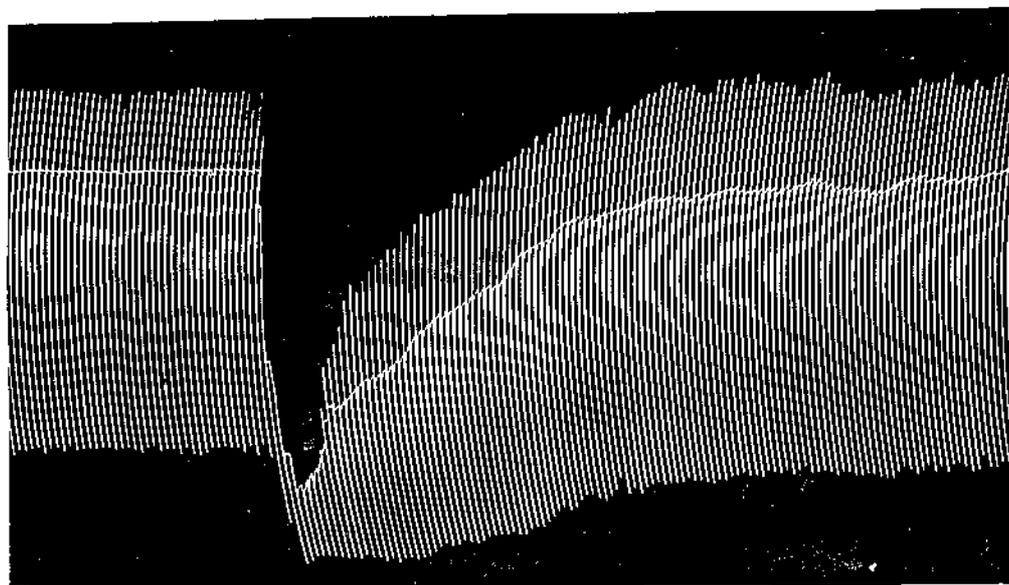
Na experiência em que, mantidas as



A ↑ crotoxina 5 mcg/ml



B crotoxina 10 mcg/ml



C ↑ crotoxina 15 mcg/ml

Figura 7 - Preparação neuromuscular isolada: frênico-diafragnal de rato.

mesmas condições anteriores, utilizou-se a dose de 10 mcg/ml de crotamina, pouco antes de sua adição suspendeu-se a estimulação, podendo-se observar imediatamente após a toxina, a ocorrência de contração espontânea do músculo com duração de 5 minutos. Ao se reiniciar a estimulação elétrica, quando a linha de base já havia se restabelecido, as contrações musculares apresentavam amplitude reduzida, com cerca de 60% do tamanho controle. Verificou-se então um aumento progressivo dessas contrações que voltaram a seu valor inicial 16 minutos após a crotamina. O incremento persistiu, chegando a atingir 3,5 vezes o tamanho controle 30 minutos após a toxina. Seguiu-se um decréscimo gradativo, com o restabelecimento da amplitude inicial após 1 hora (Fig. 7B). Nesta experiência, identificaram-se portanto, três fases distintas na resposta muscular à adição da crotamina. A primeira fase, constituída pela contração espontânea; a segunda fase de diminuição da amplitude das respostas aos estímulos isolados e a terceira fase que se iniciou cerca de 16 minutos após a adição da toxina, caracterizada por um aumento da amplitude das respostas com duração de 1 hora.

As experiências restantes foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando-se a solução nutritiva proposta por Bretag e a crotamina na dose de 15 mcg/ml. Neste grupo não se observou a ocorrência sistemática das três fases, faltando ora a segunda ora a terceira fase, que quando presentes, não foram tão nítidas e duradouras. A primeira fase, constituída pela contração espontânea, pelo contrário, manifestou-se de forma constante, imediatamente após

a adição da crotamina, com grande amplitude e duração (Fig. 7C), não havendo por vezes até 1 hora após a adição da toxina um retorno completo à linha de base. Sem fator desencadeante aparente a contração espontânea podia repetir-se a intervalos de tempo variáveis. Em algumas preparações, após cerca de 1 hora, observou-se uma diminuição progressiva das respostas musculares, ocorrendo às vezes o desaparecimento total das mesmas em 2 horas.

Com as três doses utilizadas observou-se a "after-contraction" após a estimulação tetanizante. Este fenômeno praticamente não se repetia se, logo após o relaxamento, produzia-se novo tétano (Fig. 8).

Nas duas experiências em que se procurou verificar o efeito da administração prévia de d-tubocurarina, observou-se que após o bloqueio da preparação, mantendo-se a estimulação indireta, a adição de crotamina (15 mcg/ml) era seguida imediatamente por contração muscular espontânea. Esta apresentava uma fase de encurtamento pouco mais lenta e uma amplitude cerca de 30% menor do que as verificadas nas preparações não curarizadas. Durante a contração havia uma reversão parcial do bloqueio que voltava a ser completo com o retorno à linha de base (Fig. 9).

Na experiência em que após a curarização da preparação iniciou-se a estimulação direta, imediatamente em seguida à adição de crotamina (5 mcg/ml) houve um encurtamento do músculo. Já durante este encurtamento observou-se um aumento da amplitude das contrações, que perdu-

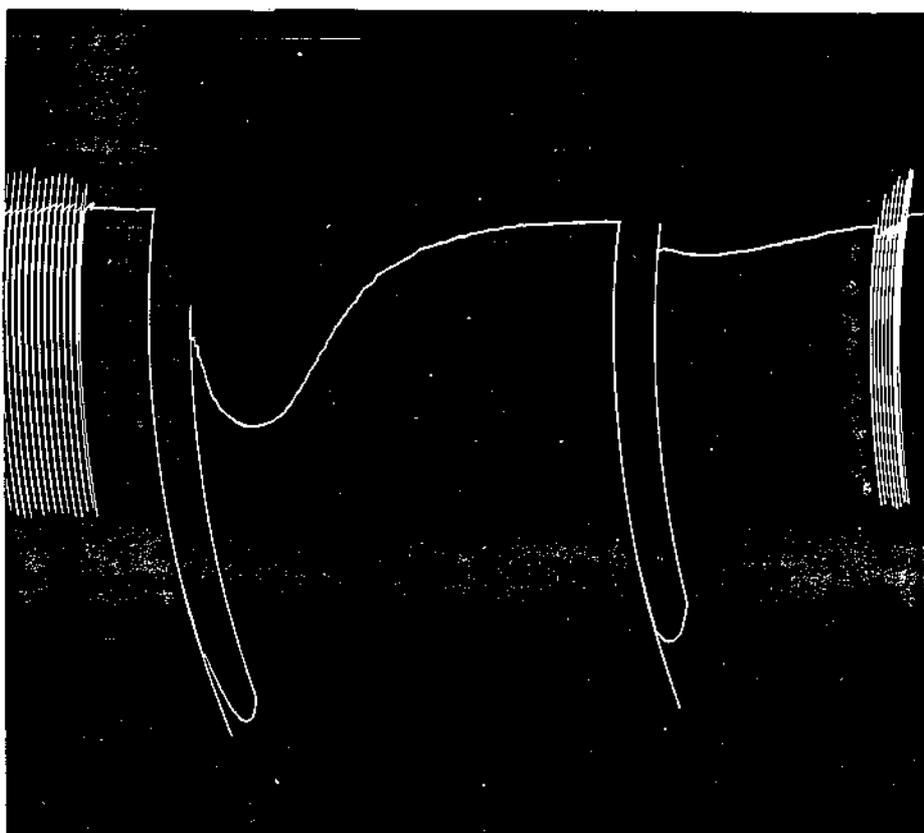
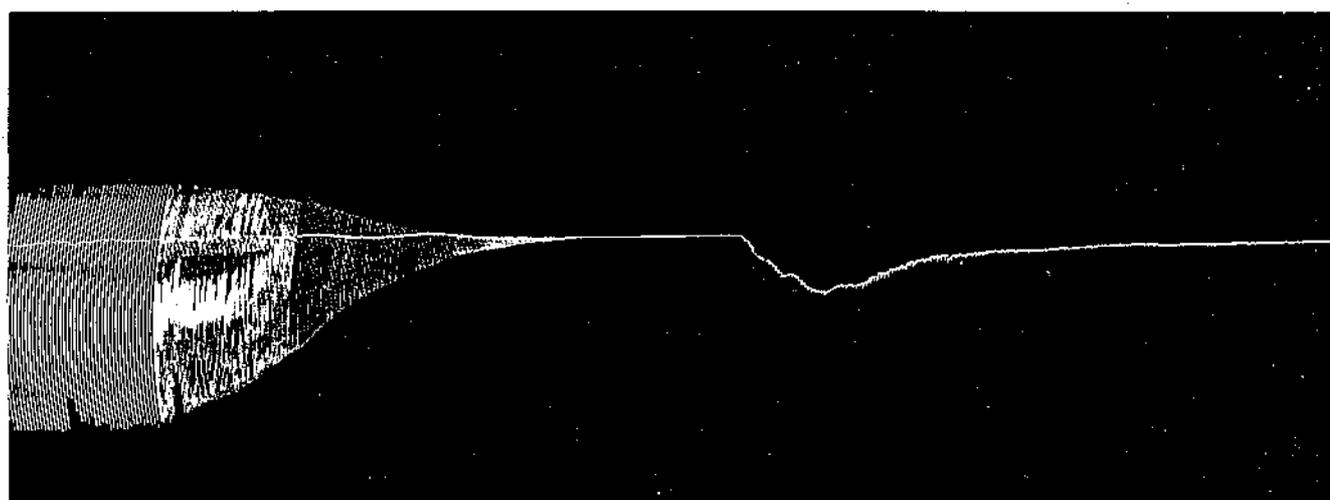


Figura 8 - Preparação neuromuscular isolada: frênico-diafragma de rato . "After-contraction" após contração tetânica. O fenômeno se repete apenas parcialmente se novo tétano é provocado logo após o relaxamento.



↑ dTc

↑ crot.

Figura 9 - Preparação neuromuscular isolada: frênico-diafragma de rato. Efeito da d-tubocurarina sobre contração espontânea provocada pela crotamina. Notar reversão parcial do bloqueio durante a contração crotamínica.

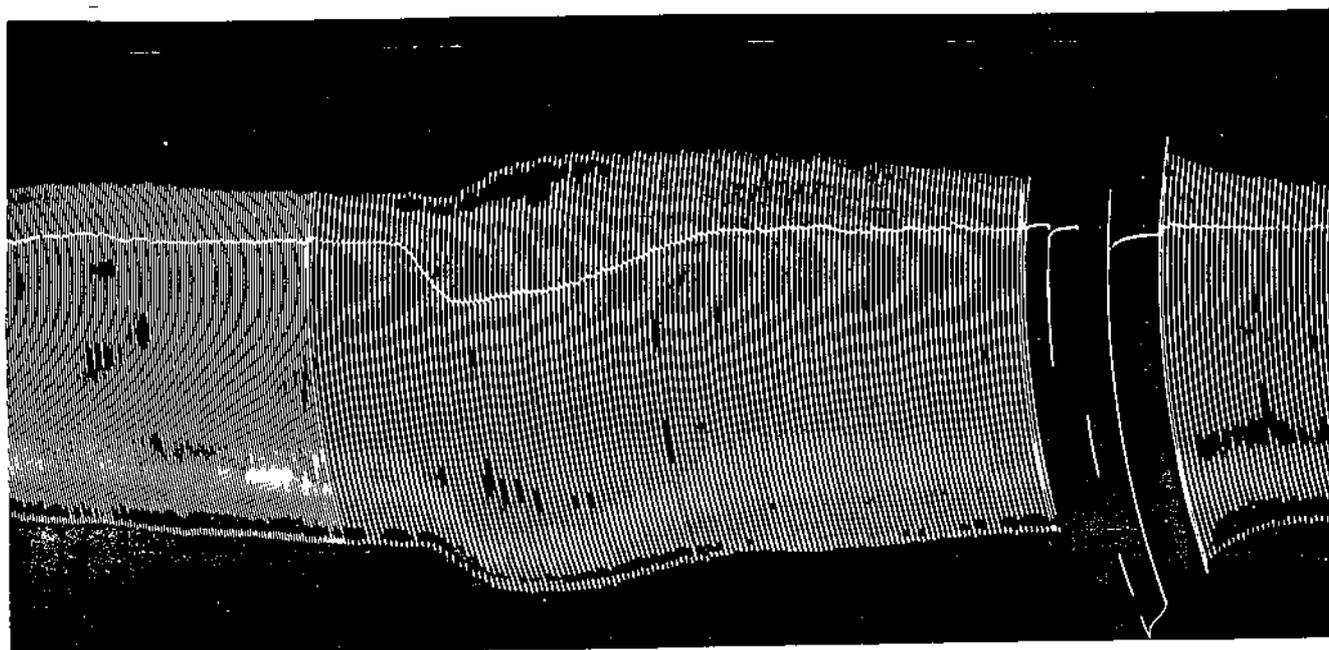
rou por cerca de 60 minutos. Após este período de tempo, as contrações voltaram à amplitude controle, tendendo posteriormente a desaparecer, o que ocorreu 2 horas após a adição da toxina.

Nas experiências em que a quinidina foi juntada preliminarmente, observou-se antagonismo à contração provocada pela crotamina. Com 10 mcg/ml de quinidina a contração atingiu cerca de 35-40% e com 20 mcg/ml não chegou a 10% do tamanho habitual (Fig. 10, A, B). Nestas preparações observou-se aumento da amplitude das respostas musculares aos estímulos isolados já em desenvolvimento antes da adição da crotamina. Com as duas doses empregadas houve abolição da "after-contraction" após o tétano (Fig. 10A).

A adição prévia de cloreto de cálcio antagonizou a contração espontânea provocada pela crotamina de forma equivalente à quinidina na dose de 10 mcg/ml, uma vez que a amplitude atingida foi cerca de 40% do controle. Ao se restabelecer a linha de base houve aumento de cerca de 40% na amplitude das respostas à estimulação indireta.

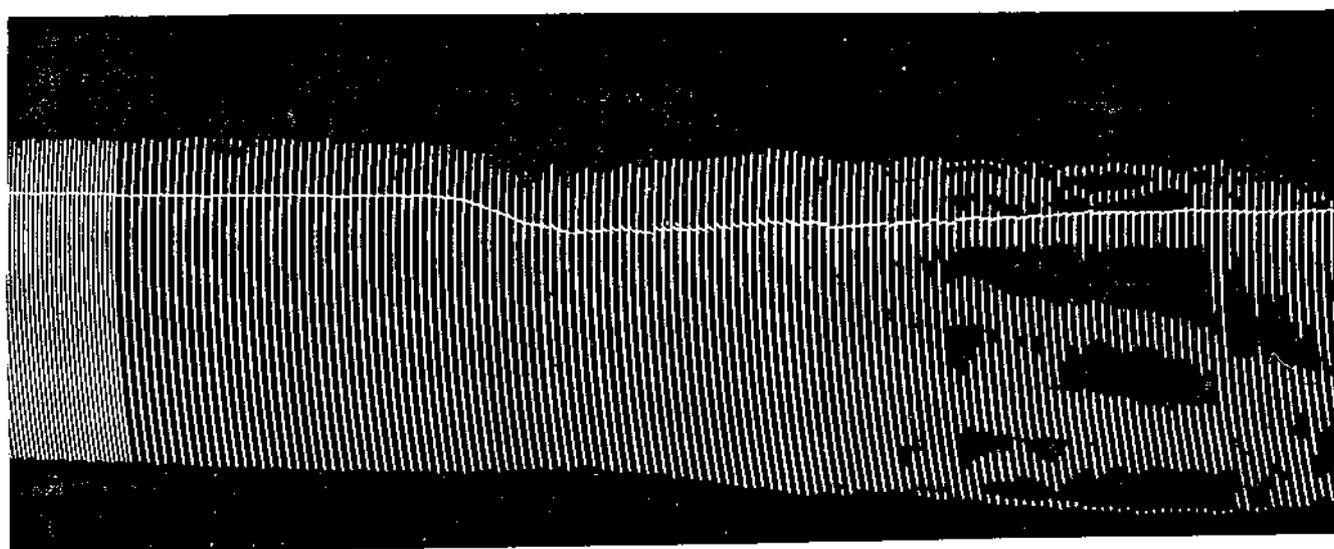
Na experiência em que se utilizou solução nutritiva com baixo sódio, logo após o desaparecimento das respostas à estimulação elétrica juntou-se crotamina (15 mcg/ml) ao banho, não ocorrendo a contração muscular espontânea. Após 3 minutos, reuniu-se ao banho KCl (1,25 mcg/ml), observando-se imediatamente o desenvolvimento da contração (Fig. 11).

O estudo eletromiográfico revelou



A

↑ crot.



B

↑ crot.

Figura 10 - Preparação neuromuscular isolada: frênico-diafragma de rato. Antagonismo da quinidina à contração muscular espontânea produzida pela crotamina. Em A - 10 mcg/ml de quinidina. Notar antagonismo também do "after-contraction" após o tétano. Em B - 20 mcg/ml de quinidina.

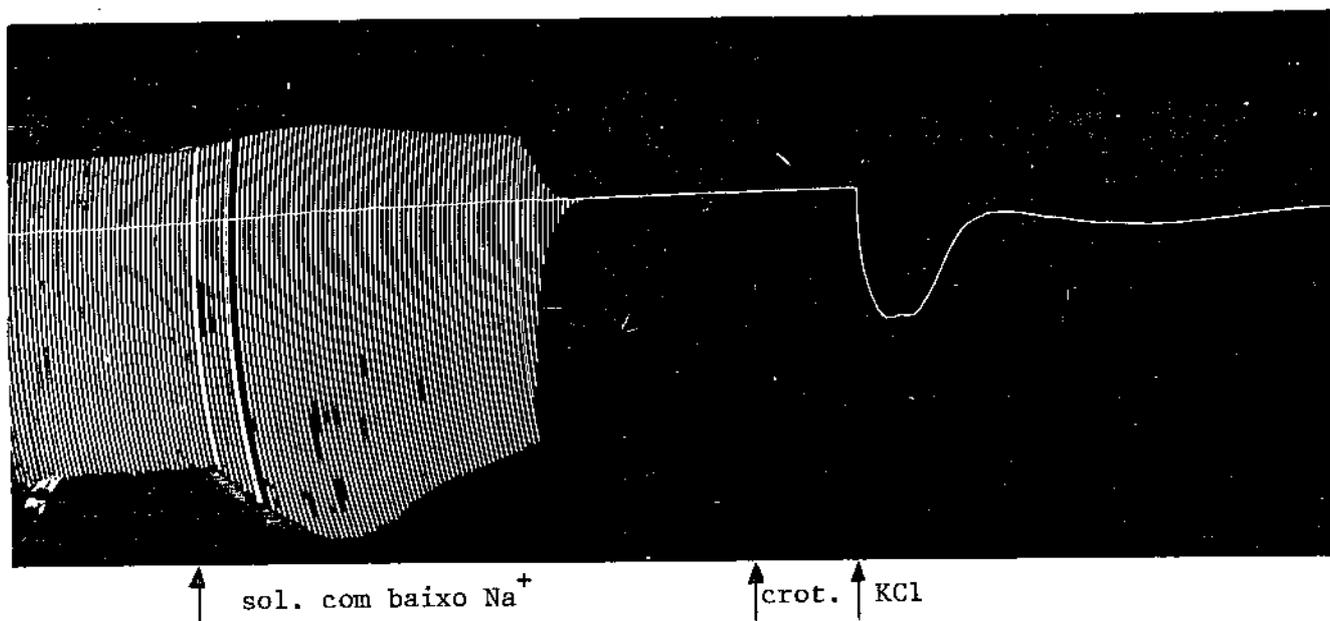


Figura 11 - Ação da crotamina na preparação neuromuscular isolada frênico-diafragma de rato em solução nutritiva com baixo sódio. Adição posterior de KCl (1,25 mcg/ml).

durante a contração espontânea que aparecia após a adição de crotamina, a presença de potenciais de pequena amplitude (50-150 uV) e curta duração (1-2 mseg) cuja frequência decrescia acompanhando o relaxamento do músculo (Fig. 12, Foto 2). Quando no registro mecânico, em seguida à contração inicial espontânea, aparecia uma diminuição da amplitude das respostas aos estímulos isolados, observava-se eletromiograficamente uma diminuição no tamanho do potencial de unidade motora somatário. O aumento da amplitude das respostas tinha sua correspondência eletromiográfica na presença de outros potenciais em seguida ao potencial de unidade motora somatário, o que às vezes chegava a sugerir que o seu número de fases se mostrava aumentado (Fig. 12, Foto 3). Durante a "after-contraction" observou-se no registro eletromiográfico a presença dos mesmos pequenos potenciais verificados durante a contração inicial (Fig. 12, Foto 4).

Nas experiências em que se tratou a preparação com d-tubocurarina, durante a contração espontânea determinada pela crotamina, notou-se também a presença dos pequenos potenciais já descritos. Com a quinidina, nas duas doses empregadas, não se observou a presença desses pequenos potenciais durante a contração espontânea parcialmente inibida. A mesma ausência foi constatada na experiência com o cloreto de cálcio.

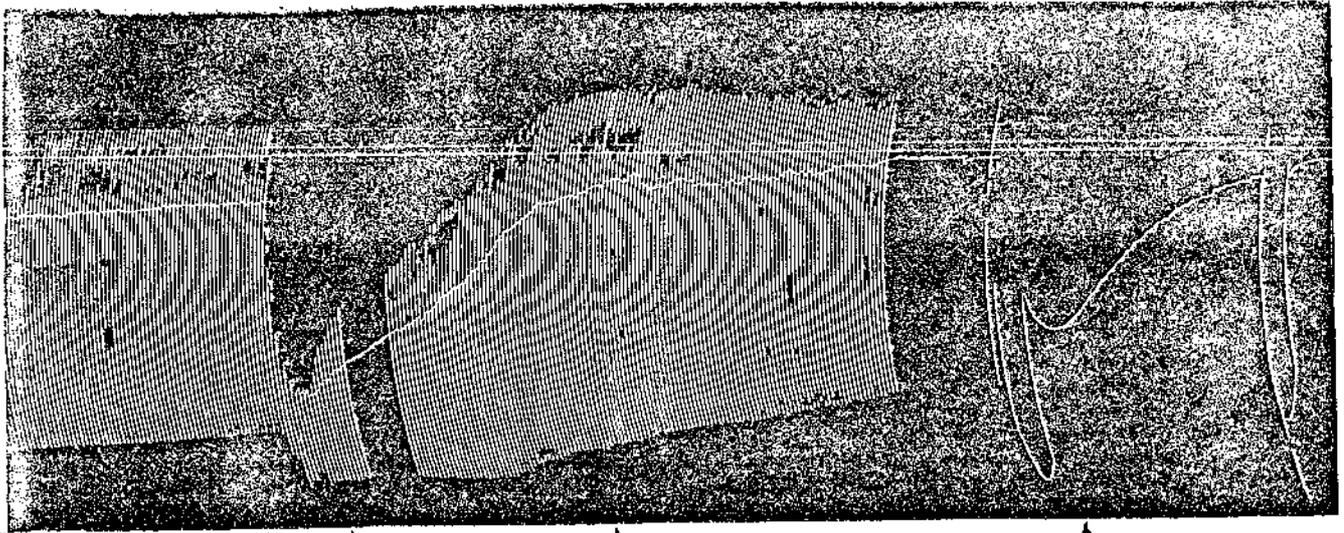


Foto 1 ↑ erot. ↑ ↑ Foto 2 ↑ Foto 3 ↑ Foto 4

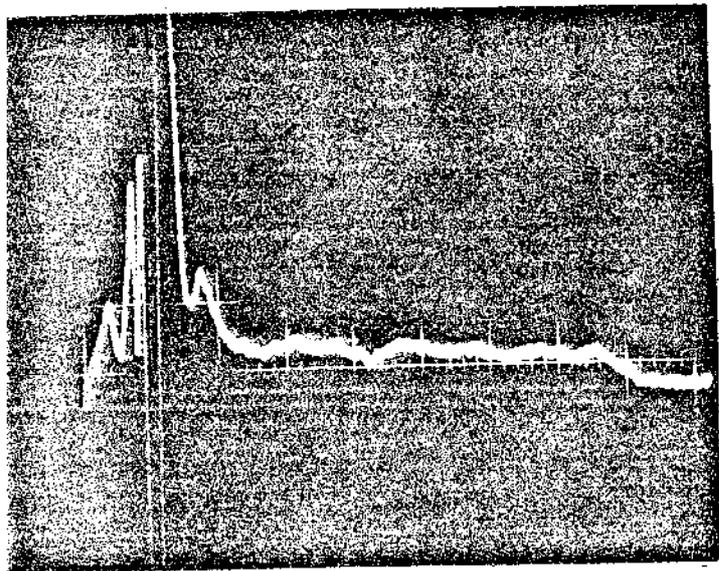


Foto 1

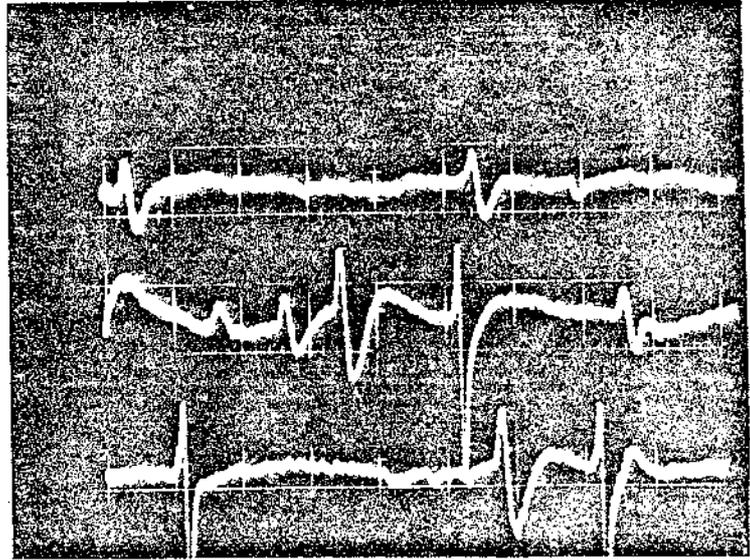


Foto 2

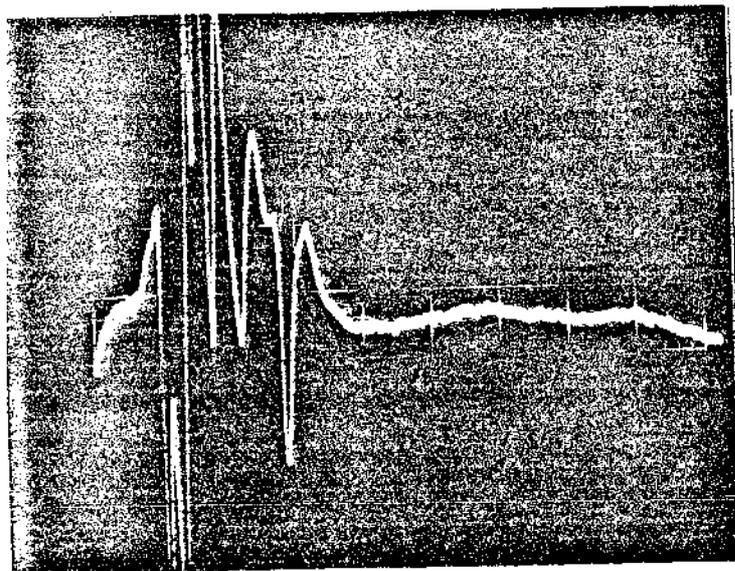


Foto 3

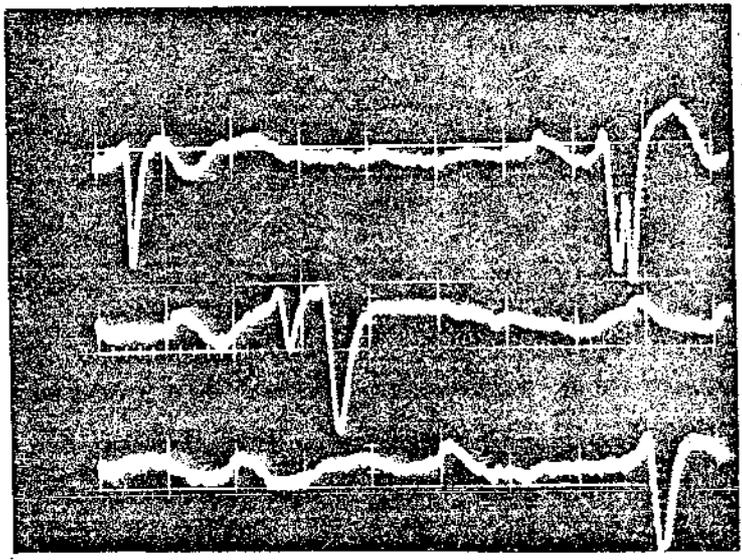


Foto 4

100 μ V
5 msec

Figura 12 - Preparação neuromuscular isolada: frênico-diafragma de rato. Registro miográfico (acima) e eletromiográfico (Fotos 1, 2, 3 e 4).

4. Diafragma de rato. Estudo do potencial de membrana e potenciais de placa terminal em miniatura com a utilização de microeletrodo intracelular

Nas três experiências em que se procurou verificar por quanto tempo, nas condições dadas, mantinha-se estável o valor do PM, pode-se constatar que por até 2 h era ele praticamente imutável. Com efeito, a média dos potenciais no início das experiências foi de -82 mV e após 2 h de -79,2 mV, uma redução de apenas 3,4%, não considerada significativa.

A adição de crotamina determinou em todas as experiências, uma despolarização da membrana das fibras musculares. A queda do PM foi sempre imediata, verificada já na primeira determinação aos 30 seg. Na Tabela I estão relacionados os valores do PM segundo a dose de crotamina empregada e o intervalo de tempo após sua adição. Observa-se uma nítida correlação entre a dose empregada e o grau de despolarização. Com 5 mcg/ml, aos 30 seg, momento em que com esta dose o registro miográfico já revela uma contração espontânea, a despolarização é mínima. A queda do potencial de repouso aos 30 seg, com 15 mcg/ml e 30 mcg/ml, é de magnitude aproximada, revelando-se bem mais intensa com 30 mcg/ml apenas nas determinações seguintes. Com todas as doses, parece haver uma rápida progressão da despolarização no intervalo entre 30 seg e 10 min, tornando-se mais lenta sua evolução no período seguinte entre 10 e 30 minutos.

Tabela I - Efeito da crotamina no potencial de membrana do diafragma isolado de rato.

Dose	Exp. nº	Controle	30 seg pós crotamina	% red.	10 min pós crotamina	% red.	30 min pós crotamina	% red.	1h 30 min pós crotamina	% red.
30 cg/ml	1	-68,0 ± 7,7	-51,0 ± 8,5	25	-35,5 ± 6,2	47,8	-32,7 ± 5,9	51,8	—	—
	2	-75,0 ± 2,7	-62,4 ± 7,3	16,8	-41,4 ± 8,7	44,8	-35,3 ± 9,5	53	—	—
	3	-71,7 ± 4,8	-51,4 ± 6,8	28,4	-37,4 ± 9,3	47,8	-37,2 ± 10,4	48,2	—	—
	Média	-71,6 ± 2,9	-54,9 ± 5,3	23,3	-38,1 ± 2,5	46,7	-35,1 ± 1,8	51	—	—
15 cg/ml	1	-73,0 ± 9,2	-57,5 ± 9,1	21,2	-45,6 ± 13,1	37,5	-48,6 ± 14,2	33,4	-27,0 ± 9,8	63
	2	-83,0 ± 11,5	-60,0 ± 5,2	27,7	-55,0 ± 6,7	33,7	-55,0 ± 11,2	33,7	—	—
	3	-86,5 ± 10,5	-63,0 ± 7,8	27,1	-61,0 ± 9,3	29,4	-50,0 ± 22,7	42,1	-43,1 ± 5,1	50,1
	4	-80,0 ± 6,5	-64,0 ± 11,5	20	-53,0 ± 11,9	33,7	-64,7 ± 7,9	20	—	—
Média	-80,6 ± 4,9	-61,1 ± 2,0	24	-53,6 ± 5,5	33,4	-54,4 ± 6,0	32,5	-35,0 ± 8,0	56,5	
5 cg/ml	1	-73,7 ± 6,3	-70,7 ± 5,2	4,1	-64,4 ± 6,7	12,6	-60,7 ± 4,5	17,6	—	—
	2	-69,0 ± 4,4	—	—	—	—	-54,8 ± 4,2	20,6	—	—
	3	-77,0 ± 5,2	-71,7 ± 3,8	6,9	-68,4 ± 3,1	11,2	-61,0 ± 4,6	20,7	—	—
Média	-73,2 ± 3,3	-71,2 ± 0,5	5,5	-66,4 ± 2,0	11,9	-58,8 ± 2,9	19,7	—	—	

Nas duas experiências com quinidina os PM controle eram -75 mV e -78 ± 6 mV e, 30 minutos após a quinidina, respectivamente, -75 mV e $-75,5 \pm 2,4$ mV. Trinta segundos após a crotamina na primeira experiência não foi possível fazer a determinação e na segunda o potencial manteve-se em $-75,5 \pm 2,4$ mV. Dez minutos após, na primeira experiência, o potencial foi de -71 mV (redução de 5,3%) e na segunda de $-75 \pm 1,9$ mV. Considerou-se insignificante a pequena variação observada, concluindo-se pelo antagonismo da quinidina (20 mcg/ml) à despolarização promovida pela crotamina (15 mcg/ml).

Na experiência com d-tubocurarina, o potencial de membrana controle foi de $-77,6 \pm 5,1$ mV e, uma hora após a adição de d-tubocurarina, já tendo se estabelecido o bloqueio neuromuscular completo, foi de $-78,4 \pm 4,8$ mV. Dez minutos pós-crotamina o PM caiu para $53,2 \pm 4,4$ (redução de 32,14%). Trinta minutos após a crotamina seu valor era de $-50,4 \pm 10,3$ mV (redução de 35,7%). Dos resultados desta experiência concluiu-se que em preparações curarizadas mantém-se o efeito despolarizante da crotamina.

Nas duas preparações em que se juntou previamente a TTX, obteve-se o seguinte resultado:

Exp.	PM controle	PM pós TTX (prep. bloq.)	30 seg pós crotamina	10 minutos	30 minutos
1	$-78 \pm 4,6$	$-81 \pm 4,8$	$-79,5 \pm 6,0$	$-80 \pm 3,2$	$-84 \pm 8,4$
2	$-85 \pm 4,5$	$-80 \pm 5,9$	$-86,0 \pm 8,4$	$-86 \pm 4,0$	$-83 \pm 4,8$

Em ambas experiências ficou evidenciado o antagonismo da TTX à despolarização determinada pela

crotamina.

Foram também duas, as experiências em que se procurou verificar o efeito da adição de crotamina sobre o PM em solução com baixo sódio. Na primeira, 7 minutos após a crotamina, adicionou-se KCl (1,25 mcg/ml) e obtiveram-se os seguintes resultados:

Exp.	PM controle	PM sol. Na (prep. bloq.)	30 seg p̄s crotamina	6 min p̄s crotamina	30 seg p̄s KCl	20 min p̄s KCl
1	-74 ± 6,1	-76 ± 5,1	-75 ± 3,4	-73,0 ± 1,9	-50 ± 8,6	-49 ± 6,9
2	-74 ± 3,3	-74 ± 4,4	—	-72,5 ± 5,7	—	—

Como se observa, o efeito despolarizante da crotamina não ocorreu em solução com baixo sódio. Manteve-se, pelo contrário, a despolarização produzida pelo KCl.

Em três experiências procurou-se verificar o efeito da adição de crotamina na amplitude e frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (MEPP). Em todas, os resultados foram coincidentes. Logo após a adição da toxina, apareciam contrações musculares que dificultavam em muito a observação dos potenciais. Após cerca de 15 minutos, a linha de base tornava-se estável, o que permitia verificar que, a intervalos de tempo variados, ocorriam grandes descargas de MEPP com duração de até 30 minutos. Durante as mesmas, a frequência era muitas vezes de difícil contagem, frequentemente acima de 400 por minuto (Fig. 13). Após estas descargas os potenciais voltavam à frequência anterior. Quanto à amplitude média dos MEPP, foi sempre verificada uma que

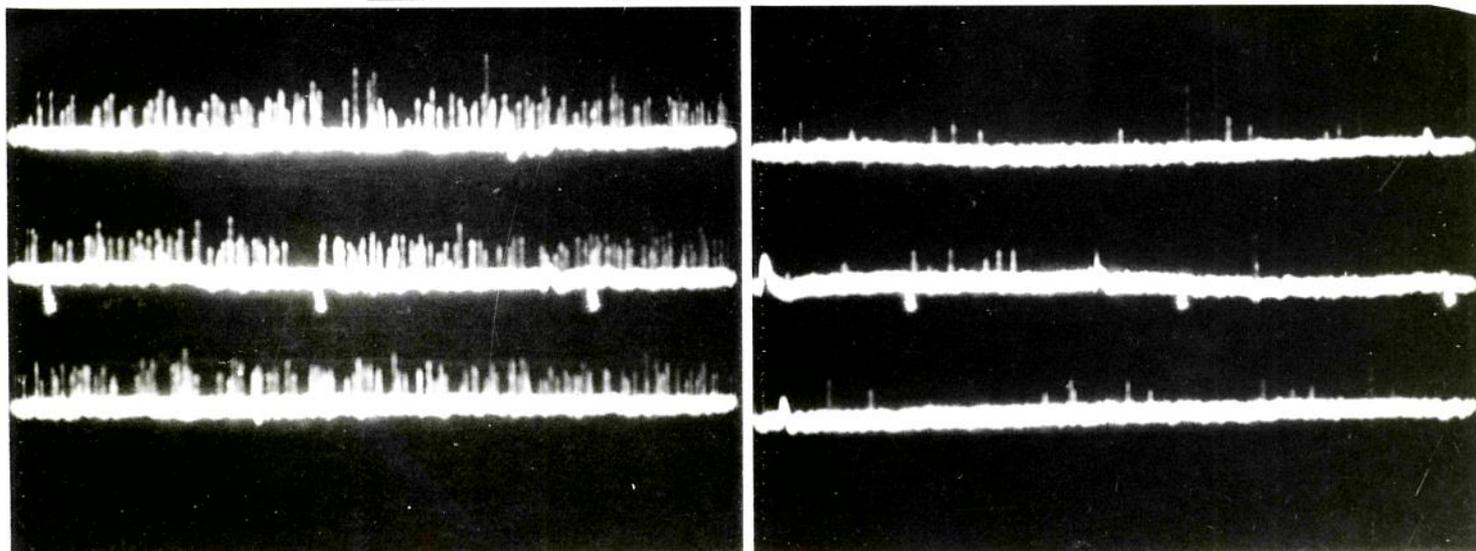
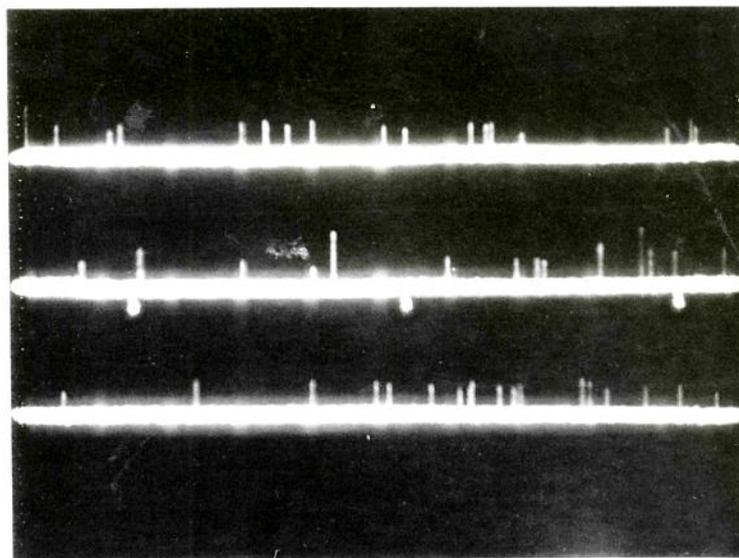


Figura 13 - Diafragma isolado de rato. Potenciais de placa terminal em miniatura (MEPP). Acima, registro controle. Abaixo, à esquerda, 1 hora e 48 min após crotamina (7,5 mcg/ml). Abaixo, à direita, 2 h e 15 min pós-crotamina. Acima, sensibilidade 1 mV/cm, velocidade 2 seg/cm. Abaixo, sensibilidade 0,5 mV/cm, velocidade 2 seg/cm. Notar abaixo à esquerda grande aumento da frequência e diminuição da amplitude dos MEPP. Abaixo à direita, logo após o término da descarga registrada à esquerda, MEPP com amplitude e frequência diminuídas em relação ao controle. Acima, 54,5% dos MEPP com amplitude entre 0,6 e 0,8 mV e 4,3% entre 0,2 e 0,4 mV. Abaixo, à esquerda, 81% dos MEPP com amplitude entre 0,2 e 0,4 mV; à direita, 94,5% dos MEPP com amplitude neste intervalo.

da acentuada após a adição da crotamina (Fig. 13).

Em uma experiência, adicionou-se , ao banho, a tetrodotoxina (TTX) e após 30 minutos a crotamina. Houve desaparecimento das contrações musculares e não se verificaram os períodos de aumento da frequência dos MEPP , nem a diminuição da amplitude dos mesmos.

DISCUSSÃO

Escolheram-se cabras para a observação dos efeitos da crotamina no animal intacto por apresentarem miotonia congênita, com quadro clínico bem definido (31, 32), possibilitando assim, um estudo comparativo entre as duas condições. De fato, nas publicações citadas há descrição minuciosa das características das crises de hipertonia, seu modo de aparecimento, membros preferencialmente atingidos, atitudes assumidas pelos animais, sendo então possível verificar que quanto a estes aspectos as crises produzidas pela crotamina são muito semelhantes às descritas em cabras miotônicas. O registro fotográfico encontrado no trabalho de KOLB mostra os animais em atitudes superponíveis àquelas verificadas com a crotamina. Apesar destas semelhanças, algumas diferenças merecem ser destacadas. Não foi possível produzir contração miotônica visível pela percussão dos músculos, fato observado nas cabras miotônicas. Nestes animais são descritas apenas as crises de hipertonia, mantendo-se o animal em condições normais nos intervalos entre elas. Em nossas experiências, além das crises de hipertonia, verificou-se no intervalo intercrítico uma grande dificuldade à marcha. Esta dificuldade foi interpretada como devida a uma diminuição da força muscular, provavelmente determinada pela despolarização das fibras musculares. A melhora nesta fase, observada com a injeção de cloreto de cálcio, deve estar relacionada à estabilização da membrana determinada pelo íon Ca^{++} .

BARRIO e VITAL BRAZIL (1), utilizando a peçonha total de Crotalus durissus terrificus crotamino-positiva (peçonha tipo I), puderam verificar que o camundongo, o rato e o cão, são sensíveis à ação crotamínica, desenvolvendo crises de hipertonia. Estes autores também constataram que os pombos e os batráquios não apresentam estas manifestações e o coelho e o cobaio o fazem de forma inconstante e pouco marcada. CHEYMOL (16, 17), utilizando a crotamina, confirmou tais achados e devido à grande sensibilidade do rato à toxina, elegeu esta espécie animal para investigar as características e o mecanismo da ação muscular da crotamina. Quanto à sensibilidade do homem, embora a crotoxina seja a grande responsável pelas manifestações neurotóxicas verificadas nos acidentes produzidos pelas cascavéis, alguns pacientes queixam-se de rigidez muscular nos membros e na nuca. De fato, dos nove casos de envenenamento crotálico descritos por WAJCHENBERG e cols. (83), dois (n^{os}. 2 e 6) apresentavam tal queixa, que muito provavelmente está relacionada à ação da crotamina.

BRYANT e MORALES-AGUILERA (58), na pesquisa da miotonia produzida pela injeção venosa do ácido antraceno-9-carboxílico, utilizaram cabras, ressaltando a similitude entre o fenômeno miotônico determinado por esta substância e o observado em cabras congenitamente miotônicas. FULLER e cols. (69) utilizaram camundongos para estudar a miotonia produzida pelo ácido indolacético, observando que a injeção intraperitoneal dessa substância determina, em poucos minutos, quando o animal tenta mover-se, crises de hiper

tonia em extensão de uma ou ambas as patas posteriores com duração de poucos segundos, durante os quais a marcha é impossível. Como se vê, há também no animal intacto grande semelhança entre as características da miotonia experimental produzida por drogas e a determinada pela crotamina.

O exame eletromiográfico das cabras feito na vigência das manifestações produzidas pela crotamina, evidenciou no animal em repouso ou anestesiado, descargas de potenciais miotônicos. VITAL BRAZIL e cols. já haviam observado a presença destes potenciais em cães e ratos, utilizando preparações neuromusculares in situ (18). Baseados neste fato, desaconselham o uso do termo contratura para designar as respostas musculares sob a ação da crotamina, como vinha sendo feito por vários autores (16, 17, 17a), uma vez que este termo deve ser reservado para nomear um "aumento prolongado da tensão do músculo não associado a potenciais de ação".

Os efeitos da ação crotamínica observados nas preparações neuromusculares in situ no rato foram muito semelhantes aos descritos na literatura (16,18,19). Em nossos experimentos com estas preparações não observamos, entretanto, como CHEYMOL (16), em seguida à contração muscular determinada pela injeção de crotamina, uma fase de inibição das respostas à excitação indireta do músculo, por sua vez seguida de potenciação dessas respostas a estímulos maximais. Não verificamos o período de depressão das respostas, havendo passagem direta da fase de contração espontânea à potenciação das respostas à excitação indireta do músculo.

Nas preparações neuromusculares isoladas tivemos oportunidade de observar a fase de depressão. Parece-nos apropriado relacionar este fenômeno com a dificuldade à marcha apresentada pelas cabras. Ambos seriam a expressão de um bloqueio neuromuscular parcial devido à despolarização das fibras musculares determinada pela crotamina. É interessante, por outro lado, notar que em pacientes portadores de Miotonia Congênita (84), a estimulação elétrica repetitiva do nervo ulnar com frequência de 5-8 Hz determina uma rápida diminuição e desaparecimento do potencial de unidade motora somatório. Instala-se uma paralisia durante cerca de 20 segundos, após o que, o músculo volta gradativamente a responder à estimulação elétrica que se manteve ininterrupta. Se o paciente contrai o músculo voluntariamente por 5 minutos e se reintroduz a estimulação, desaparece a diminuição de amplitude. Os autores admitem que a observação desta paralisia é interessante, pois permite uma nova explicação para a imobilidade que acomete os pacientes portadores de Miotonia Congênita logo ao iniciar seus movimentos. A explicação clássica limitava-se a admitir um espasmo dos antagonistas como responsável. Durante a estimulação, o período de desaparecimento dos potenciais e de paralisia muscular é reduzido pelas drogas usadas no tratamento da miotonia, como procainamida e a difenilhidantoína. Outros estudos (85, 86, 87, 88) assinalam o mesmo fenômeno da Distrofia Miotônica e Paramiotonia Congênita. Não há relatos para as miotonias das cabras e as induzidas por drogas. Quanto ao mecanismo de sua produção, parece não haver defeito na liberação de acetilcolina como na síndrome de Eaton-Lambert, uma vez que a guanidina não produz

nenhum efeito antagônico. Da mesma forma, a não resposta aos anticolinesterásicos e a sensibilidade normal ao curare, tornam pouco provável uma ação pós-sináptica ao nível dos receptores colinérgicos. A manutenção da amplitude do potencial de ação evocado no nervo ulnar durante a estimulação repetitiva afasta defeito da condução nervosa. Por estes motivos, assim como pela presença do fenômeno quando se estimula diretamente o músculo, sua origem parece estar em alteração própria da fibra muscular miotônica (85). Como, porém, sua presença e intensidade não se relacionam com o grau de miotonia apresentado pelo paciente, é possível que esteja subordinada a distúrbio independente daquele responsável pelas respostas iterativas da membrana da fibra muscular. No caso da Moléstia de Steinert, a existência do componente distrófico torna a análise mais complexa (86). Quanto à diminuição da força muscular que se desenvolve com a estimulação repetitiva ou juntamente com a miotonia nos pacientes com Paramiotonia Congênita de Von Eulenburg, admite-se que a mesma se deva a uma diminuição progressiva da excitabilidade da membrana da fibra muscular (87, 88), talvez relacionada com um distúrbio nos mecanismos responsáveis por sua repolarização (88). É interessante observar que a fase de depressão das respostas à estimulação elétrica iterativa indireta observada nas preparações neuromusculares in situ e in vitro com a crotamina, é semelhante à descrita nos trabalhos citados. Infelizmente não há até o momento um conhecimento mais preciso sobre a gênese desse fenômeno nos pacientes miotônicos. Como já se disse, no caso da crotamina admitimos estar relacionado não às descargas iterativas miotônicas, mas à despolarização das fi

bras musculares, uma vez que não ocorre com doses que não produzem queda do potencial de membrana.

Os demais efeitos musculares dependentes da ação crotamínica como retardo na descontração ou "after-contraction" em seguida à resposta provocada por estímulos isolados ou tetanizantes, manifestaram-se em nossos experimentos com as mesmas características já descritas anteriormente (1, 16, 18, 19). O mesmo ocorreu com o fenômeno da taquifilaxia.

Diversos autores (1, 13, 16, 18, 19), ao procurarem esclarecer o mecanismo de ação da crotamina, utilizaram de forma muito apropriada as preparações neuromusculares in situ, acumulando uma série de dados valiosos e já bem estabelecidos, pelo que não nos preocupamos em reproduzi-los em nossa série de experimentos. Assim é que se verificou que tanto a estimulação direta como a indireta dos músculos provocam, indiferentemente, os efeitos descritos. Com pequenas variações, os músculos cronicamente desnervados apresentam os mesmos fenômenos característicos descritos para os inervados. Estes dados indicam que a crotamina age fundamentalmente na membrana da fibra muscular (1, 13, 18). Em preparações total ou parcialmente bloqueadas pela galamina, d-tubocurarina ou decametônio, os efeitos musculares também estão presentes (1, 10, 17, 18), o que reforça a afirmação anterior, tornando também praticamente afastada a ação da toxina através dos receptores colinérgicos. Nas preparações bloqueadas com d-tubocurarina ou decametônio (16, 17) os efeitos musculares apresentam apenas discretas diferenças em relação aos obtidos sem estas substâncias. Há uma fase de dimi

nuição da amplitude das contrações em resposta à estimulação elétrica mais marcada no caso da d-tubocurarina e uma contração inicial espontânea geralmente menos intensa no caso do decametônio. É interessante notar que uma vez recuperadas do bloqueio, estas preparações tornam-se menos sensíveis a uma segunda dose de d-tubocurarina e, pelo contrário, mais sensíveis a uma segunda dose de decametônio. Estes fatos devem estar relacionados à despolarização produzida pela crotamina.

Também em preparações neuromusculares in situ verificou-se que os íons cálcio e magnésio, bem como a quinina e a tetrodotoxina (TTX), antagonizam os efeitos musculares da crotamina (1, 16). Os íons magnésio produzem um bloqueio neuromuscular por diminuir a liberação de acetilcolina ao nível das terminações nervosas da placa motora e associadamente a sensibilidade da placa terminal à ação despolarizante do neurotransmissor. Estas ações não devem, no entanto, estar implicadas no antagonismo observado. Estudos com clampeamento de voltagem realizados em fibras musculares de rã demonstraram que os íons cálcio e magnésio diminuem a excitabilidade da membrana muscular, aumentando o limiar de despolarização necessário para ativar o aumento específico da permeabilidade ao sódio. O limiar de excitação da membrana passa de -54 mV na ausência de magnésio para cerca de -32 mV com 18 mM de magnésio, sendo o cálcio duas vezes mais ativo (89). A quinidina também apresenta efeito estabilizador da membrana da fibra muscular. Ela altera a permeabilidade ao sódio de tal forma que, embora sem afetar o potencial de repouso, aumenta o limiar de excitabilidade da mem -

brana e prolonga a duração do potencial de ação em cerca de 100%. Este prolongamento se deve a uma diminuição da velocidade de despolarização e repolarização. Para a reativação da condutância ao sódio, a repolarização da membrana deve ser maior na presença desta droga, o que causa um aumento do período refratário (90). Estas ações explicam sua atividade su pressora das respostas iterativas. A TTX inibe especificamente o fluxo dos íons sódio através das membranas excitáveis (74). Esta especificidade é tão marcada que a torna um importante instrumento de pesquisa farmacológica, podendo-se mesmo considerar que alterações na permeabilidade ao íon sódio devem estar envolvidas na gênese de determinado efeito quando este é antagonizado pela TTX.

Os dados eletromiográficos obtidos em nossas experiências com preparações neuromusculares in situ são muito semelhantes àqueles descritos por VITAL BRAZIL e cols. (18). Com o registro simultâneo pode-se estabelecer uma correlação miográfica e eletromiográfica entre as várias fases da contração inicial espontânea determinada pela crotamina. Observou-se que esta contração é acompanhada de descargas prolongadas de potenciais miotônicos cuja frequência tende a diminuir acompanhando o relaxamento do músculo (Fig. 4). Na fase de aumento da amplitude das contrações em resposta à es timulação indireta do músculo a eletromiografia mostrava as descargas dos potenciais miotônicos sucedendo ao potencial de unidade motora somatório (Fig.5). A dificuldade à des contração e o fenômeno do "after-contraction" também são acompanhados de potenciais miotônicos, conforme já haviam observado VITAL

BRAZIL e cols. (18). Com base nos resultados de seus experimentos, estes autores concluíram que as respostas musculares sob a ação da crotamina são iterativas em músculos inervados curarizados ou não e em músculos cronicamente desnervados, devendo ser considerados como contrações tetânicas assíncronas das fibras musculares. Apesar de algumas diferenças, como a resposta ao estímulo mecânico, as características miográficas e eletromiográficas da intoxicação pela crotamina são, na opinião desses autores, muito semelhantes às do músculo miotônico. Esta observação levaram-nos a propor a classificação da intoxicação pela crotamina entre as miotonias. Apesar de muitos de nossos dados serem coincidentes, reforçando a analogia proposta, a verificação de despolarização acentuada das fibras musculares causada pela crotamina introduz novo elemento a considerar. Com efeito, embora às descargas de potenciais miotônicos possa ser imputada parte das características miográficas descritas, a despolarização das fibras deve necessariamente concorrer para a gênese de alguns dos efeitos verificados. Acreditamos lícito considerar que algumas das respostas musculares sob a ação da crotamina provavelmente dependem de um mecanismo misto, podendo em parte serem consideradas como contraturas (contratura por despolarização) e em parte como fenômeno miotônico.

Na preparação isolada nervo frênico-diafragma de rato pode-se verificar a influência da dose de crotamina adicionada ao banho. Com efeito, utilizando-se 5 mcg/ml foi observada a contração espontânea inicial e já durante a mesma aumento na amplitude das respostas muscula -

res à estimulação elétrica indireta, que chegaram a atingir, quando do retorno à linha de base, cerca de 2 a 2,5 vezes sua amplitude anterior. Com 10 mcg/ml pode-se comprovar que a contração inicial é espontânea, pois ocorreu na ausência da estimulação elétrica, verificando-se logo após, no reinício da estimulação, que a amplitude das respostas musculares estava diminuída, com posterior aumento e superação de seu tamanho primitivo. Portanto, uma fase de diminuição da amplitude das respostas ocorreu com 10 mcg/ml e não com 5 mcg/ml, mantidas as mesmas condições de temperatura. CHEYMOL e cols. (17) observaram esta fase nos seus experimentos com preparações neuromusculares in situ, mas não nas isoladas, muito provavelmente devido à dose de crotamina que empregaram (3,5 mcg/ml). Com dose de 15 mcg/ml notou-se uma grande contração espontânea inicial, algumas vezes sem retorno à linha de base e a ocorrência inconstante da segunda e da terceira fase. Estes experimentos, entretanto, foram realizados à temperatura ambiente e com solução nutritiva proposta por Bretag, portanto, em condições distintas das anteriores. Optou-se pela temperatura ambiente para que se pudesse estabelecer uma correlação entre os dados verificados nesta preparação e aqueles obtidos com o emprego de microeletrodos intracelulares. Em se considerando o componente miotônico das respostas musculares sob a ação da crotamina era de se esperar, em experiências à temperatura ambiente, sua exacerbação, uma vez que é conhecida a influência da baixa temperatura no agravamento da miotonia. LIPICKY e BRYANT (91) não conseguiram encontrar a causa dessa piora da miotonia clínica com o esfriamento. Determinando os parâmetros da membrana de fibras musculares

de intercostal externo isolado retirado de cabras normais e miotônicas, constataram que a resistência da membrana diminuía com a diminuição da temperatura. Estes achados contrastam com experiências anteriores em músculos esqueléticos isolados de anfíbios e crustáceos, em que se verificou que a resistência da membrana aumenta com a diminuição da temperatura. Observaram também que a condutância ao cloro diminui com o aumento da temperatura, concluindo pela impossibilidade de explicação a partir de seus dados do que se observa clinicamente. O comportamento dos parâmetros em relação à temperatura foi semelhante nas fibras normais e miotônicas.

A eletromiografia nestas preparações neuromusculares isoladas revelou a presença dos mesmos potenciais miotônicos já observados nas cabras e nas preparações in situ durante a contração espontânea. Na segunda fase, quando se constata uma diminuição do tamanho das respostas musculares, observou-se uma diminuição da amplitude do potencial de unidade motora somatório, o que traduz a não resposta de algumas fibras musculares ao estímulo elétrico, provavelmente devida à despolarização. Na terceira fase, de aumento da amplitude das contrações, observou-se logo em seguida ao potencial de unidade motora somatório, a presença de outros potenciais, o que sugere que este aumento da amplitude seja devido a um breve tétano.

Durante a contração secundária ou "after-contraction" que se seguia a um tétano, foram também observados os potenciais miotônicos, o que define o caráter miotônico do fenômeno. A não ocorrência desta contração em

seguida a um segundo tétano provocado logo após o retorno à linha de base sugere uma analogia com o "warm-up phenomenon".

A taquifilaxia foi constante e, segundo CHEYMOL e cols. (17) ela é recíproca entre a peçonha total tipo I e a crotamina.

A curarização da preparação isolada não aboliu a contração espontânea nem as descargas de potenciais miotônicos que a acompanham, embora tenha alterado suas características, tornando-a mais lenta e com amplitude menor. CHEYMOL e cols. (17) que não haviam observado alterações nas respostas em preparações neuromusculares in situ curarizadas, também relatam um retardo e diminuição da amplitude da contração inicial espontânea provocada pela crotamina no diafragma isolado de rato em que foi adicionada previamente a d-tubocurarina. Este fato, associado à observação de que no diafragma cronicamente desnervado a resposta à toxina também é atenuada, levaram estes autores a postular no caso do diafragma isolado de rato a possibilidade da participação das placas motoras na gênese da contração determinada pela crotamina. O aumento na frequência da descarga de potenciais de placa terminal em miniatura promovida pela crotamina por nós verificado, revela uma ação pré-juncional da toxina que, embora acessória, deve estar relacionada a estas observações.

Na preparação curarizada em que se manteve uma estimulação elétrica direta, observou-se o aumento da amplitude das contrações maximais, o que exclui uma origem pré-juncional deste fenômeno. A abolição das respostas

musculares à estimulação direta observada nesta preparação e à estimulação indireta em outras preparações não curarizadas, 2 horas após a adição da toxina, deve ser imputada à despolarização prolongada e crescente das fibras musculares até a inexcitabilidade.

Com a adição prévia da quinidina , comprovou-se o antagonismo já conhecido. Com a dose de 20 mcg/ml houve abolição quase completa dos efeitos determinados pela toxina. Com 10 mcg/ml o antagonismo foi parcial, observando-se ainda uma contração espontânea com 35-40% de seu tamanho habitual. Fato digno de nota é que nesta situação , bem como quando da adição prévia de cloreto de cálcio, apesar da existência de uma contração parcial, o eletromiograma não revelou os potenciais miotônicos. Esta contração parcial residual não pode, portanto, ser definida como de natureza miotônica, tratando-se de uma contratura. Estas observações sugerem, conforme já foi mencionado anteriormente, que a contração inicial espontânea determinada pela crotamina em preparações neuromusculares isoladas deve depender de um mecanismo misto, podendo em parte ser considerada como contratura e em parte como fenômeno miotônico. A adição da quinidina determinou um aumento da amplitude das respostas musculares aos estímulos elétricos isolados. SENGES e cols. (90) verificaram que a quinidina em concentrações entre 10 e 100 mcg/ml, determina na preparação nervo frênico-diafragma de rato, um aumento e em seguida uma diminuição da amplitude das contrações. Com 100 mcg/ml constataram que o pico máximo de aumento da amplitude nessas preparações ocorre aos 30 minutos, quan

do atinge duas vezes o valor inicial, retornando ao tamanho controle aos 40 minutos. Nessa dose, após cerca de 1 hora, o músculo entra em contratura, relaxando e respondendo novamente à estimulação com a lavagem da preparação-

Nas experiências em que a crotamina foi adicionada à preparação banhada em solução nutritiva com baixo sódio, verificou-se a ausência total da contração muscular espontânea. É lícito, portanto, considerar-se o sódio como necessariamente envolvido em sua gênese. A ocorrência de contratura após a adição do potássio indica que a membrana permanecia polarizada e que o mecanismo contrátil das fibras musculares estava perfeitamente funcionante.

BRETAG (80) realizou uma investigação sobre o fluido intersticial do rato, a partir do que, propôs uma solução nutritiva que seria um "fluido intersticial sintético". Com ela o potencial de membrana de repouso manter-se-ia constante por longo período de tempo. De fato, nas três experiências controle que realizamos utilizando esta solução nutritiva à temperatura ambiente, o potencial de repouso manteve-se praticamente inalterado por 2 horas.

A mínima despolarização verificada aos 30 seg com a adição de crotamina na dose de 5 mcg/ml (5,5% de redução do PM em relação ao controle) não pode ser responsabilizada pelo encurtamento muscular que já se observa neste momento com esta mesma dose. Sua origem deve depender exclusivamente das descargas iterativas de pequenos potenciais, o que o caracteriza nestas condições como um fenômeno essencialmente miotônico.

Com a quinidina utilizada na dose de 20 mcg/ml não ocorreu a despolarização produzida pela crotamina, o que explica a supressão completa dos efeitos da toxina verificada com o emprego desta dose nas preparações neuromusculares isoladas.

A d-tubocurarina não impediu a queda do potencial de repouso determinada pela crotamina. Este fato, associado à ausência da despolarização verificada com o emprego da tetrodotoxina e soluções com baixo sódio, permite concluir que a queda do potencial de repouso se deve exclusivamente a aumento da permeabilidade da membrana das fibras musculares ao sódio e que para sua ocorrência não há participação das placas motoras.

A frequência controle dos potenciais de placa terminal em miniatura (MEPP) manteve-se em torno de 25-40/minuto. Os grandes aumentos transitórios da frequência dos MEPP verificados com a adição da crotamina devem estar relacionados à despolarização da membrana das terminações nervosas. Esta é devida a aumento da permeabilidade ao sódio, uma vez que a tetrodotoxina impede o incremento da frequência dos MEPP provocado pela crotamina. A diminuição da amplitude dos MEPP deve ser imputada à despolarização da membrana da fibra muscular determinada pela crotamina. Não se verificou esta diminuição com a adição prévia da TTX. LEE (92) já havia observado na preparação neuromuscular isolada biventre cervical de pinto, que a crotamina promove liberação do mediador.

O conjunto de dados obtidos através dos vários experimentos realizados nos permitem formular hipóteses sobre o provável mecanismo de ação da crotamina. Uma série de evidências anteriores já enumeradas e por nós também verificadas indicam que sua ação principal ocorre ao nível da membrana da fibra muscular. Em se tratando de uma grande molécula (PM 5000), os efeitos imediatos, praticamente sem latência, que ocorrem nas preparações isoladas após sua adição, sugerem que a toxina age na superfície da fibra muscular, promovendo alterações nas propriedades da membrana celular. Destas, a fundamental seria um aumento na permeabilidade ao íon sódio, o que levaria em doses suficientes, à despolarização da membrana. Também devido a este aumento na permeabilidade ao sódio ocorreriam descargas iterativas de potenciais de ação da fibra muscular. Poderia ser considerada a hipótese de sua origem depender de uma maior duração da corrente de sódio para o interior da fibra muscular durante o potencial de ação, levando a um prolongamento do pós-potencial negativo e, portanto, do período de excitabilidade supernormal da fibra. Este mecanismo é proposto por ser ele o imputado na gênese de descargas análogas induzidas pela veratrina (71), cujas semelhanças com a crotamina são discutidas adiante. As descargas iterativas produzidas pela crotamina aparecem mesmo em doses ainda insuficientes para determinar queda significativa do potencial de membrana de repouso. Conclui-se deste fato que os efeitos musculares verificados com estas doses menores dependem quase exclusivamente das descargas iterativas, o que os caracteriza como fenômenos essencialmente miotônicos. Com doses maiores, a contração espontânea

imediate deve depender de mecanismo misto, para ela contribuindo a despolarização da membrana da fibra muscular e as descargas miotônicas. A dificuldade à descontração e a contração secundária ("after-contraction"), abolidas pela quinidina em doses insuficientes para impedir a contratura por despolarização, devem ser também encaradas como fenômenos de natureza miotônica. A despolarização das terminações nervosas, igualmente devida a aumento da permeabilidade ao sódio, seria a responsável pelo incremento na frequência de descarga dos MEPP, efeito de importância secundária na origem das manifestações produzidas pela crotamina. Esta toxina permaneceria de forma duradoura ligada às membranas das terminações nervosas e da fibra muscular, o que explicaria o retorno dos efeitos a intervalos de tempo variáveis e a taquifilaxia.

Em relação a outras toxinas animais, alguma analogia poderia ser sugerida entre a crotamina e a batracotoxina. Trata-se de substância tóxica secretada por glândulas cutâneas da rã Phyllobates aurotaenia, ainda utilizada por indígenas colombianos em suas flechas. ALBUQUERQUE e cols. (81, 93) realizaram estudo exaustivo desta toxina, verificando que produz contratura em duas fases nas preparações neuromusculares isoladas de rato e despolarização prolongada da membrana da fibra muscular causada por aumento específico da permeabilidade ao sódio. A contratura e a despolarização são antagonizadas pela TTX e não ocorrem quando é utilizada solução nutritiva com baixo sódio. Determina também aumento acentuado na frequência dos MEPP, que, ao contrário do que ocorre com a crotamina, é prolongado e seguido de

desaparecimento destes potenciais e de bloqueio neuromuscular. A natureza pré-juncional do bloqueio foi demonstrada pela aplicação microiontoforética da acetilcolina, uma vez que, após 30 minutos de bloqueio, a sensibilidade ao mediador na região da placa terminal permanecia inalterada. Como se vê, são notórias algumas semelhanças entre as duas toxinas, porém, existem diferenças muito importantes, dentre as quais, a não ocorrência das descargas iterativas com a batracotoxina.

CHEYMOL e cols., em uma revisão (94), descrevem os efeitos das peçonhas de diferentes espécies de escorpiões do norte da África na musculatura esquelética, os quais poderiam sugerir uma aproximação com aqueles de terminados pela crotamina. Em preparações neuromusculares isoladas de diafragma de rato, a adição da peçonha de escorpião determina de imediato aumento da amplitude das contrações e após 10 a 40 minutos, contratura seguida de bloqueio progressivo da preparação. Antes do bloqueio total ocorrem novas contraturas espontâneas, com paralisia secundária parcialmente reversível após cada uma. Estes fenômenos ocorrem em preparações curarizadas e desnervadas e são antagonizados pela TTX, mas não pelo Ca^{++} e Mg^{++} . O efeito contraturante da acetilcolina sobre o diafragma cronicamente desnervado ou sobre o reto abdominal de rã se mantém, o que indica ausência de ação sobre as placas motoras. Tudo aponta, portanto, para uma ação direta na membrana da fibra muscular. Apesar de serem várias as semelhanças entre a crotamina e as toxinas escorpiônicas, com estas não foram descritas descargas

iterativas, além de sua ação apresentar uma cinética diferente e seus efeitos serem pouco antagonizados pelos íons Ca^{++} e Mg^{++} .

VITAL BRAZIL e cols. (95), estudando a peçonha de escorpião amarelo brasileiro Tityus serrulatus, obtiveram resultados distintos. Na preparação frênico-diafragma de rato isolada, não verificaram contração mantida após a adição da peçonha, mas uma série de "twitches" espontâneos, além de aumento da amplitude da contração maximal a estímulos indiretos e retardo na descontração. Não obtiveram estes efeitos em preparações desnervadas ou curarizadas. Este fato, associado à observação de liberação de acetilcolina, em preparações inervadas, os levaram a considerar pré-juncional a origem dos efeitos observados. WARNICK e cols. (96) realizaram estudo eletrofisiológico com a tityustoxina (TsTX), toxina isolada da peçonha de Tityus serrulatus. Na preparação frênico-diafragma isolada também não obtiveram contração mantida, porém, observaram os "twitches" espontâneos, a potencialização da contração maximal por estimulação direta e indireta e o prolongamento do tempo de relaxamento. Em preparações curarizadas persistem, segundo esses autores, a potencialização da contração maximal à estimulação direta e o retardo no relaxamento. O início da potencialização da contração maximal coincide com o prolongamento do potencial de ação produzido pela estimulação direta e com a despolarização da membrana da fibra muscular e precede os efeitos pré-sinápticos da toxina. A despolarização da membrana e o prolongamento do potencial de ação persistem com a adição de

d-tubocurarina e alfa-bungarotoxina, o que exclue a participação das placas motoras em sua gênese. Os efeitos pré-sinápticos são constituídos por aumento transitório da frequência de descarga dos MEPP e por descarga iterativa de potenciais de placa terminal (EPP) em seguida a um único estímulo do nervo. Esta descarga iterativa dos EPP parece ser a responsável pelos "twitches" espontâneos que são antagonizados pela d-tubocurarina. Os efeitos pré e pós-sinápticos são abolidos pela TTX e não ocorrem em soluções nutritivas com baixo sódio. Isto sugere que a TsTX afeta a condutância ao sódio de repouso e a relacionada à gênese do potencial de ação nas membranas pré e pós-sinápticas. O retardo na descontração não é dependente de uma descarga iterativa assíncrona, o que impede a caracterização do fenômeno como miotônico .

BARRIO e VITAL BRAZIL (1) sugeriram pela primeira vez que as ações da crotamina seriam semelhantes às da veratrina. Os efeitos comuns seriam a potencialização da contração maximal, a dificuldade à descontração, contrações espontâneas secundárias, os sinais verificados no animal intato, além do antagonismo destes efeitos verificado com o Ca^{++} , Mg^{++} e a quinidina. A estas analogias atualmente é possível acrescentar a presença das descargas iterativas assíncronas e a alteração da permeabilidade da membrana ao sódio. CHEYMOL e cols. (97) reconhecem a similitude entre os efeitos da crotamina e veratrina, lembrando também a sensibilização ao K^+ que determinam no reto abdominal de rã. Consideram, porém, uma diferença essencial, qual seja, a presença da "contratura" seguida de paralisia determinada apenas pela

crotamina. Entretanto, segundo KRAYER e ACHESON (70), a vera trina em altas doses também determina encurtamento espontâ - neo mantido do músculo, verificado no sartório e no reto abdominal de rã. Apesar da ausência de uma justaposição comple - ta dos efeitos da crotamina e da veratrina no músculo esque - lético, as várias coincidências apontadas autorizam sugerir um mecanismo de ação semelhante. Ambas poderiam ser entendi - das como drogas determinantes de miotonia, tendo como ação fundamental o aumento da permeabilidade da membrana da fibra muscular ao sódio.

Finalmente, já foi mencionado o fa - to da miotonia ser um fenômeno bem definido clínica e eletro - miograficamente que, no entanto, parece admitir substratos fisiopatológicos diversos. Assim, em relação às miotonias ve - rificadas em patologia humana, acreditamos que os dados obti - dos neste e em estudos anteriores permitem aproximar a mioto - nia determinada pela crotamina daquela observada em pacien - tes com Adinamia Episódica Hereditária. Nas fibras muscula - res destes pacientes também é constatada uma queda do poten - cial de membrana de repouso e no início do ataque paralítico são observadas as descargas miotônicas. Assim como na intoxi - cação pela crotamina, uma alteração na permeabilidade da mem - brana ao sódio parece estar implicada na origem do fenômeno. Uma analogia com a miotonia da Distrofia Miotônica também po - de ser sugerida, uma vez que neste caso, também se verifica queda no potencial de repouso e é postulada uma alteração na permeabilidade ao sódio.

CONCLUSÃO

A crotamina deve ser classificada, conforme já sugerido anteriormente, entre as substâncias que produzem miotonia. Por estar envolvida uma alteração da permeabilidade da membrana da fibra muscular ao sódio em sua origem, a miotonia por dela determinada aproxima-se da produzida pela veratrina e das observadas na Moléstia de Steinert e na Adinamia Episódica Hereditária.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo contribuir para o estudo da ação da crotamina no músculo esquelético. Quatro grupos de experiências foram realizados. A toxina foi injetada em cabras, procurando-se observar e registrar as manifestações clínicas e eletromiográficas por ela determinadas. Foram também utilizadas preparações neuromusculares in situ e isoladas com registros miográfico e eletromiográfico dos efeitos musculares da toxina. Estudaram-se também as alterações do potencial de membrana de repouso e dos potenciais de placa terminal em miniatura da fibra muscular sob a ação da crotamina, através da utilização de microeletrodo intracelular. Com estas experiências obtiveram-se, em resumo, os seguintes resultados:

1. A crotamina produziu em cabras sinais clínicos e eletromiográficos muito semelhantes àqueles observados na miotonia congênita desta espécie animal.

2. Os potenciais miotônicos descritos anteriormente em preparações neuromusculares in situ foram também verificados em preparações neuromusculares isoladas, durante a contração espontânea e a contração secundária ("after-contraction") determinadas pela crotamina.

3. A adição de crotamina ao diafragma isolado de rato determinou de imediato uma despolarização

zação prolongada da fibra muscular.

4. Após cerca de 15 minutos da adição de crotamina ao diafragma isolado de rato ocorreu transitoriamente grande aumento da frequência de descarga dos potenciais de placa terminal em miniatura com duração de até 30 minutos, repetindo-se a intervalos de tempo variáveis.

5. Verificou-se que a queda do potencial de repouso da fibra muscular e o incremento da frequência dos MEPP são dependentes de aumento da permeabilidade das terminações nervosas e da fibra muscular ao sódio, uma vez que ambos efeitos são abolidos pela tetrodotoxina e não ocorrem quando se utiliza solução nutritiva com baixo sódio.

O conjunto destes resultados autoriza-nos a propor, como já sugerido anteriormente, que a crotamina seja classificada entre as substâncias que produzem miotonia. Como está envolvida uma alteração da permeabilidade da membrana ao sódio em sua origem, a miotonia por ela determinada aproxima-se da induzida pela veratrina e das observadas na Moléstia de Steinert e na Adinamia Episódica Hereditária.

BIBLIOGRAFIA

1. BARRIO, A. e VITAL BRAZIL, O. - Neuromuscular action of the Crotalus durissus terrificus (Laur.) poisons. Acta Physiol. Latinoamer., 1: 291, 1951.
2. MOURA-GONÇALVES, J. e VIEIRA, L.G. - Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. An. Acad. Bras. Cienc., 22: 141, 1950.
3. MOURA GONÇALVES, J. e POLSON, A. - The electrophoretic analysis of snake venoms. Arch. of Biochem., 13(2): 253, 1947.
4. BARRIO, A. - Estudio electroforético del veneno de serpiente de cascabel. Ciencia e Investigación, 10: 368 , 1954.
5. MOURA GONÇALVES, J. e DEUTSCH, H.F. - Ultracentrifugal and Zone Electrophoresis studies of some crotalidae venoms. Arch. Biochem. Biophys., 60: 402, 1956.
6. MOURA GONÇALVES, J. - Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. II. Crotalus terrificus crotaminicus, sub espécie biológica. An. Acad. Bras. Cienc., 28: 365, 1956.
7. KLAUBER, L.M. - (Discussão) In MOURA GONÇALVES, J. - Purification and properties of crotamine. In Venoms, pág. 273. E.E. Buckley and N. Porges (eds.). Publ. nº 44 of the American Association for the Advancement of Sciences. Washington, D.C., 1956.
8. MOURA CONÇALVES, J. - Estudos sobre crotamina. Tese apresentada para provimento do cargo de Professor Catedrático de Bioquímica e Físico-química da Faculdade de Me

dicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo ,
1961.

9. BARRIO, A. - Consideraciones en torno a Crotalus terrificus crotaminicus Moura Gonçalves. Physis., 22(63): 141, 1961.
10. SCHENBERG, S. - Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. Science, 129: 1361, 1959.
11. MOURA GONÇALVES, J. - Purification and properties of crotamine. In Venoms, pág. 261. E.E. Buckley and N. Porges (eds.). Publ. n° 44 of the American Association for the Advancement of Sciences, Washington, D.C., 1956.
12. SILVA, M.H.; SOLEWICZ, E.; SILVA Jr. J.G.; ZAGANELLI FILHO, G. e DOMONT, G.B. - Estrutura primária da crotamina. Ciência e Cultura, 25(9): 869, 1973.
13. CHEYMOL, J.; BOURILLET, F.; ROCH-ARVEILLER, M. e THACH TOAN. - Effets neuromusculaires des venins des deux variétés de Crotalus durissus terrificus. Arch. Int. Pharmacodyn., 179: 40, 1969.
14. CHEYMOL, J.; BOURILLET, F. e ROCH-ARVEILLER, M. - Venins et toxines de serpents. Effets neuromusculaires. Actualités Pharmacologiques (Masson et Cie., eds.), 25a. série, 179, 1972.
15. CHEYMOL, J.; BOURILLET, F. e ROCH-ARVEILLER, M. - Action neuromusculaire des venins des quelques Crotalidae , Elapidae et Hydrophiidae. Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac., 33: 541, 1966.

- 16 . CHEYMOL, J.; MOURA-GONÇALVES, J.; BOURILLET, F. e ROCH-ARVEILLER, M. - Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de Crotalus durissus terrificus var. crotaminicus. I. Sur préparations neuromusculaires in situ. Toxicon, 9: 279, 1971.
- 17 . CHEYMOL, J.; MOURA-GONÇALVES, J.; BOURILLET, F. e ROCH-ARVEILLER, M. - Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de Crotalus durissus terrificus var. crotaminicus. II. Sur préparations isolées. Toxicon, 9: 287, 1971.
- 17A. MOUSSATCHÉ, H. VIEIRA, G.D. - Sobre o mecanismo da contração produzida pelo veneno de cascavel (Crotalus terrificus terrificus). An. Acad. Bras. Cien., 25: 249, 1953.
- 18 . VITAL BRAZIL, O.; PRADO-FRANCESCHI, J. e LAURE, C.J. - Estudo eletromiográfico do músculo esquelético sob a ação da crotamina. (Em publicação).
- 19 . VITAL BRAZIL, O. - Neurotoxins from the South American rattlesnake venom. J. Formosan Med. Assoc., 71: 394, 1972.
- 20 . BOUDOURESQUES, J.; SERRATRICE, G. e KHALIL, R. - La maladie de Thomsen. In Encyclopédie Medico-Chirurgicale, 5, fasc. 17179 A10, 1963, Paris.
- 21 . LICHT, S. - Electrodiagnostico y electromiografia. Editorial Jims, Barcelona, pág. 370, 1a. ed. espanhola, 1970 .
- 22 . ZELLWEGER, H. e IONASESCU, V. - Myotonic dystrophy and its differential diagnosis. Acta Neurol., Scand., suppl. 55, vol. 49, 1973.
23. CAUGHEY, J.E. e MYRIANTHOPOULOS, N.C. - Dystrophia Myotonica and related disorders. Charles C. Thomas Publisher, pág. 9, 1a. ed., Springfield, Ill., 1963.
- 24 . SCAFF, M.; TSANACLIS, A.M.C. e LEVY, J.A. - Distrofia Mio tônica. Aspectos clínico-laboratoriais em 19 casos . Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo), 32(3): 199, 1974.

25. CAPPOEN, J.P.; LHERMINE, C. e PRAYE, C. - Les manifesta-
tions digestives au cours de la Maladie de Steinert.
Lille med., 18(10): 1215, 1973.
26. LUNDBERG, P.O.; STALBERG, E. e THIELE, B. - Paralysis Pe-
riodica Paramyotonica. A clinical and neurophysiologi-
cal study. J. Neurol. Sci., 21: 309, 1974.
27. TRUSH, D.C.; MORRIS, C.J. e SALMON, M.V. - Paramyotonia
Congenita: A clinical, histochemical and pathological
study. Brain, 95: 537, 1972.
28. ENGEL, W.K. - Myotonia: A different point of view.
Calif. Med., 114(2): 32, 1971.
29. ABERFELD, D.C.; NAMBA, T.; VYE, M.V. e GROB, D. - Chondro
dystrophic myotonia: report of two cases. Arch.
Neurol., 22: 455, 1970.
30. BRUMLIK, J. e CUETTER, A.C. - Denervation myotonia. A sub
clinical electromyographic finding. Electromyography,
9: 297, 1969.
31. KOLB, L.C. - Congenital myotonia in goats. Bull. Johns
Hop. Hosp., 63: 221, 1938.
32. BROWN, G.L. e HARVEY, A.M. - Congenital myotonia in the
goat. Brain, 62(4): 341, 1939.
33. SAMAHA, F.J.; SCHROEDER, J.M.; REBEIZ, J. e ADAMS, R.D. -
Studies on Myotonia. Biochemical and electron microscop
ic studies on Myotonia Congenita and Myotonia Dystro-
phica. Arch. Neurol., 17: 22, 1967.
34. HOFMANN, W.W.; ALSTON, W. e ROWE, G. - A study of indivi-
dual neuromuscular junctions in myotonia. Electroen-
ceph. Clin. Neurophysiol., 21: 521, 1966.

35. McCOMAS, A.J.; CAMPBELL, M.J. e SICCA, R.E.P. - Eletro-physiological study of Dystrophia Myotonica. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 34: 132, 1971.
36. McCOMAS, A.J.; SICCA, R.E.P. e CAMPBELL, M.J. - "Sick" motoneurons. A unifying concept of muscle disease. Lancet, 1: 321, 1971.
37. KALYANARAMAN, K.; SMITH, B.H. e CHADHA, A.L. - Evidence for neuropathy in Myotonic Muscular Dystrophy. Bull. Los Angeles Neurol. Soc., 38: 188, 1973.
38. BROOKE, M.H. - The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fibre types. III. Myotonias, Myasthenia Gravis and Hypokalemic Periodic Paralysis. Neurology, 19: 469, 1969.
39. RADU, H.; RADU, A.; PENDEFUNDA, G.; DARKO, Z.; BLUCHER, G. e GODRI, I. - Studio comparativo e correlativo delle miotonie. Acta Neurol. (Napoli), 25: 421, 1970.
40. ENGEL, W.K. - Selective and non-selective susceptibility of muscle fiber types. A new approach of human neuromuscular diseases. Arch. of Neurol., 22: 97, 1970.
41. Mac DERMOT, V. - The histology of the neuromuscular junction in Dystrophia Myotonica. Brain, 84: 75, 1961.
42. PANAYIOTOPOULOS, C.P. e SCARPALEZOS, S. - Neural and muscular involvement in Dystrophia Myotonica. Lancet, 2: 329, 1975.
43. SWASH, M. - The morphology and innervation of the muscle spindle in Dystrophia Myotonica. Brain, 95: 357, 1972.
44. RADU, H.; RADU, A. e BLUCHER, G. - Quantitative study of the myotonic state. Correlative biochemical, histoenzimological and electrical investigation. Europ. Neurol.

4: 100, 1970.

45. BHATT, G.P.; VIJAYAN, N. e DREYFUS, P.M. - Myotonia. A review of its clinical implications. Calif. Med., 114 (2): 16, 1971.
46. BRODY, I.A. - Muscle contracture induced by exercise. A syndrome attributable to decreased relaxing factor. New Eng. J. Med., 281(4): 187, 1969.
47. WAERNES, E. - Neuromyotonia and bronchial carcinoma. Electromyogr. Clin. Neurophysiol., 14: 527, 1974.
48. VERMEIJ, G.B.G. - Pseudomyotonia. Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 29: 319, 1970.
49. LIBERATI, F.; ZANASI, M.; AMABILE, G.; CAPORALI, M.; RIZZO, P.A. e PANICHELLI, C. - La pseudomiotonia; alcune considerazioni cliniche e terapeutiche. Riv. Neurol. 44(4): 271, 1974.
50. BRODY, I.A. - Myotonia induced by monocarboxylic aromatic acids. A possible mechanism. Arch. Neurol., 28: 243, 1973.
51. RADU, H.; GODRI, I.; ALBU, E.; RADU, A. e ROBU, R. - Calcium uptake and bioelectrical activity of denervated and myotonic muscle. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 33: 294, 1970.
52. MUNSAT, T.L. - Therapy of myotonia. A double-blind evaluation of diphenylhydantoin, procainamide and placebo. Neurology, 17: 359, 1967.
53. NORRIS Jr., F.H. - Unstable membrane potential in human myotonic muscle. Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 14: 197, 1962.

54. CREUTZFELD, O.D.; ABBOTT, B.C.; FOWLER, W.M. e PEARSON, C.M. - Muscle membrane potentials in Episodic Adinamia. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 15: 508, 1963.
55. McCOMAS, A.J. e MROZEK, K. - The electrical properties of muscle fibre membranes in Dystrophia Myotonica and Myotonia Congenita. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 31: 441, 1968.
56. LIPICKY, R.J.; BRYANT, S.H. e SALMON, J.H. - Cable parameters, sodium, potassium, chloride and water content and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with Myotonia Congenita. *J. Clin. Invest.*, 50: 2091, 1971.
57. LIPICKY, R.J. e BRYANT, S.H. - Ions content, potassium efflux and cable properties of myotonic human external intercostal muscle. *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, 96: 34, 1971.
58. BRYANT, S.H. e MORALES-AGUILERA, A. - Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibres and the action of monocarboxylic aromatic acids. *J. Physiol.*, 219 : 367, 1971.
59. RUDEL, R. e SENGES, J. - Mammalian skeletal muscle: reduced chloride conductance in drug-induced myotonia and induction of myotonia by low-chloride solution. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 274: 337, 1972.
60. BARCHI, R.L. - Myotonia, An evaluation of the chloride hypothesis. *Arch. Neurol.*, 32: 175, 1975.
61. EYZAGUIRRE, C.; FOLK, B.P.; ZIERLER, K.L. e LILIENTHAL Jr, J.L. - Experimental myotonia and repetitive phenomena: the veratrinic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D) in the rat. *Amer. J. Physiol.*, 155: 69, 1948.

62. SENEGES, J. e RUDEL, R. - Experimental myotonia in mammalian skeletal muscle: changes in contractile properties. *Pflügers Arch.*, 331: 315, 1972.
63. RUDEL, R. e SENEGES, J. - Experimental myotonia in mammalian skeletal muscle: changes in membrane properties. *Pflügers Arch.*, 331: 324, 1972.
64. WINER, N.; MARTT, J.M.; SOMERS, J.E.; WOLCOTT, L.; DALE, H.E. e BURNS, T.W. - Induced myotonia in man and goat. *J. Lab. & Clin. Med.*, 66(5): 758, 1965.
65. SOMERS, J.E. e WINER, N. - Reversible myopathy and myotonia following administration of a hypocholesterolemic agent. *Neurology*, 16: 761, 1966.
66. EBERSTEIN, A. e GOODGOLD, J. - Induced myotonia in fast and slow muscles of the rat. *Experientia*, 25: 1269, 1969.
67. WAKAMATSU, H.; NAKAMURA, H.; ITO, K.; ANAZAWA, W.; OKAJIMA, S.; OKAMOTO, S.; SHIGENO, K. e GOTO, Y. - Serum desmos_{terol} and other lipids in Myotonic Dystrophy. *Keio J. Med.*, 19: 145, 1970.
68. CACCIA, M.R.; BOIARDI, A.; ANDREUSSI, L. e CORNELIO, F. - Nerve supply and experimental myotonia in rats. *J. Neurol. Sci.*, 24: 145, 1975.
69. FULLER, R.W.; LACEFIELD, W.B.; KATTAU, R.W.; NICKANDER, R. C. e SNODDY, H.D. - Myotonia produced by indoleacetic acid. Studies with related compounds and correlation with drug levels in tissues. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 193: 48, 1971.
70. KRAYER, O. e ACHESON, G.H. - The pharmacology of the *vera* trum alkaloids. *Physiol. Rev.*, 26: 383, 1946.

71. FRANK, G.B. - Effect of veratrine on muscle fibre membrane and on negative after-potential. J. Neurophysiol., 21: 263, 1958.
72. ZLOTKIN, E. - Chemistry of animal venoms. Experientia, 29(2): 1453, 1973.
73. Von HAHN, H.P. e HONEGGER, C.G. - Animal neurotoxins in neurobiological research. Experientia, 30(1): 2, 1974.
74. CHEYMOL, J. e BOURILLET, F. - Tetrodotoxin and saxitoxin. In Neuromuscular Blocking and Stimulating Agents, vol. I, pág. 175. J. Cheymol (ed.). Section 14 of the International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics. Pergamon Press, 1st edition, Great-Britain, 1972.
75. GOLDSTEIN, G. - The thymus and neuromuscular function. A substance in thymus which causes myositis and myasthenic neuromuscular block in guinea-pigs. Lancet, 2: 119, 1968.
76. BENDER, A.N.; ENGEL, W.K.; RINGEL, S.P.; DANIELS, M.P. e VOGEL, Z. - Myasthenia Gravis: a serum factor blocking acetylcholine receptors of the human neuromuscular junction. Lancet, 1: 607, 1975.
77. HARPER, P.S. e DYKEN, P.R. - Early-onset Dystrophia Myotonica. Evidence supporting a maternal environmental factor. Lancet, 2: 53, 1974.
78. KRULL, G.H.; LYNSE, B., VIETOR, W.P.J.; WLIENER, M.; BRAAK, J.W.G. e GERBRANDY, J. - Myotonia produced by an unknown humoral substance. Lancet, 2: 668, 1966.
79. BULBRING, E. - Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. Brit. J. Pharmacol., 1: 38, 1946.

80. BRETAG, A.H. - Synthetic interstitial fluid for isolated mammalian tissue. *Life Sci.*, 8: 319, 1969.
81. WARNICK, J.E.; ALBUQUERQUE, E.X. e SANSONE, F.M. - The pharmacology of batrachotoxin. I. Effects on the contractile mechanism and on neuromuscular transmission of mammalian skeletal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 176(3): 497, 1971.
82. EXCELL, B.J. - Experiments on synaptic transmission using the frog sartorius nerve-muscle preparation. *Exp. in Physiol. and Biochem.*, 3: 211, 1970.
83. WAJCHENBERG, L.; SESSO, J. e INAGUE, T. - Feições clínico-laboratoriais do envenenamento crotálico humano. *Rev. Ass. Med. Bras.*, 1: 179, 1954.
84. RICKER, K. e MEINCK, H.M. - Muscular paralysis in Myotonia Congenita. *Europ. Neurol.*, 7: 221, 1972.
85. BROWN, J.C. - Muscle weakness after rest in myotonic disorders: an electrophysiological study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 37: 1336, 1974.
86. MONGIA, S.K. e LUNDERVOLD, A. - Electrophysiological abnormalities in cases of Dystrophia Myotonica. *Europ. Neurol.*, 13: 360, 1975.
87. BURKE, D.; SKUSE, N.F. e LETHLEAN, A.K. - Contractile properties of the abductor digiti minimi muscle in Paramyotonia Congenita. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 37: 894, 1974.
88. ISCH, F.; ISCH-TREUSSARD, C.; JESEL, M. e WARTER, J.M. - Étude électromyographique de deux cas de Paramyotonia congénitale de von Eulenburg. *Rev. Neurol.*, 118: 536, 1968.

89. ENGBAER, L. - Inhibitor ion Magnesium. In Neuromuscular Blocking and Stimulating Agents, vol. I, pág. 391. J. Cheymol (ed.). Section 14 of the International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics. Pergamon Press, 1st edition, Great Britain, 1972.
90. SENGES, J.; RUDEL, R. e KUHN, E. - Effects of quinidine , procaine amide and N-propyl-ajmaline on skeletal muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 276: 25, 1973.
91. LIPICKY, R.J. e BRYANT, S.H. - Temperature effects on cable parameters and K efflux in normal and myotonic goat muscle. Am. J. Physiol., 222: 213, 1972.
92. LEE, C.Y. - Comunicação pessoal ao Prof. Dr. Oswaldo Vital Brazil.
93. ALBUQUERQUE, E.X.; WARNICK, J.E. e SANSONE, F.M. - The pharmacology of batrachotoxin. II. Effect on electrical properties of the mammalian nerve and skeletal muscle membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther., 176(3): 511, 1971.
94. CHEYMOL, J.; BOURILLET, F. e ROCH-ARVEILLER, M. - Venins et toxines de scorpions, effets neuromusculaires. Actualités Pharmacologiques, Masson et Cie. (éditeurs) 25a. série, pág. 241, 1972.
95. VITAL BRAZIL, O.; NEDER, A.C. e CORRADO, A.P. - Effects and mechanism of action of Tityus serrulatus venom on skeletal muscle. Pharmacol. Res. Com., 5(2): 137, 1973.
96. WARNICK, J.E.; ALBUQUERQUE, E.X. e DINIZ, C.R. - Electrophysiological observations on the action of the purified scorpion venom, tityustoxin, on nerve and skeletal muscle of the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther., (In press).

97. CHEYMOL, J.; BOURILLET, F. e ROCH-ARVEILLER, M. - L'action de la crotamine est-elle veratrinique? J. Physiol., Paris, 56: 321, 1964.