

CA 27/PC 13

ILMA DA SILVA CARVALHO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA GUANIDINA
NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

*Este exemplar foi devidamente
catalogado conforme
resolução da CCPG/636/83
de 11/11/85
Lea Rodrigues Simioni*

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba da
UNICAMP, para a obtenção do tí-
tulo de Doutor em Ciências,
área de Farmacologia.

BR. 910.2060

Piracicaba

1991

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus filhos

Ana Lúcia, Cintia Maria,
Maria Inês, Guido Ivan e
Míriam.

Paulo, valeu a pena, não foram
em vão a sua generosidade, a
sua dignidade, o seu amor, a
sua esperança. Seus filhos têm
a sua grandeza.

(em memória)

AGRADECIMENTO

À Profa. Dra. Lêa Rodrigues-Simioni, com minha admiração pela retidão de caráter, pela seriedade científica com que prossegue na sua incansável e determinada luta, agradeço pela orientação deste trabalho, pela amizade e inestimável apoio que sempre nos dedicou.

À Profa. Dra. Julia Prado Franceschi, pelos ensinamentos, críticas e valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Vital Brasil, pela oportunidade de conviver com o seu notório saber.

Aos professores: Dr. Alexandre P. Corrado (Departamento de Farmacologia da F.M. de Ribeirão Preto — USP); Dr. Marcos D. Fontana (Departamento de Farmacologia — FCM — UNICAMP), pelo auxílio, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling (Centro de Microscopia Eletrônica — Instituto de Biologia — UNICAMP), pela colaboração, que possibilitou os estudos morfológicos deste trabalho.

Aos profs. Dr. João Leonel José, Dr. Tales Rocha de Mattos Filho e Dra. Maria de Lourdes G. da Gama (do Departamento de Farmacologia, FOP-UNICAMP) pela maneira humana e digna sempre presente no trato cordial. Assim como a todos os professores da equipe de pós-graduação em Farmacologia-FOP que durante os anos de 1983 e 1984, contribuíram para a minha formação científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo no início de nossa formação.

Ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas por ter permitido o afastamento de nossas atividades didáticas.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Farmacologia, especialmente Edson Antunes e Nadim F. Heluany pela amizade e colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Gildo Bernardo Leite, técnico de laboratório (Departamento de Farmacologia, FCM-UNICAMP) pela amizade e valiosa ajuda na montagem das experiências.

A Vilma (Secretária do Departamento de Farmacologia — FOP-UNICAMP), Terezinha (técnica em fotografia — Centro de Microscopia Eletrônica — Inst. de Biol.— UNICAMP), Solange, Dora, Gislaine, Maria Rita e Noemi, pela cordialidade e serviços técnicos prestados.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
I - INTRODUÇÃO	1
II - MATERIAL E MÉTODOS	11
1 - MATERIAL	12
1.1 - Drogas	12
1.2 - Animais	12
1.3 - Solução Nutritiva	12
2 - MÉTODOS	13
2.1 - Teste de Toxicidade Aguda: DL50	13
2.2 - Estudo Miográfico	13
2.2.1 - Preparação nervo frênico-dia- fragma isolado de camundongo .	13
2.2.2 - Preparação nervo frênico-dia- fragma isolado de rato	14
2.2.3 - Preparação diafragma desnerva- do de rato	15
2.3 - Registro Intracelular	16
2.3.1 - Preparação nervo frênico-dia- fragma isolado de camundongo .	16
2.3.2 - Medida de biopotenciais	16

	<u>Página</u>
a) Potencial de repouso	16
b) Potencial de placa terminal em miniatura	17
c) Potencial de ação composto do músculo	18
2.4 - Estudo Morfológico	18
III - RESULTADOS	21
1 - TOXICIDADE DA GUANIDINA	22
2 - EFEITO DA GUANIDINA EM PREPARAÇÃO NERVO FRÊN- NICO ISOLADO DE CAMUNDONGO E RATO	22
2.1 - Registro da força de contração do dia- fragma de camundongo	22
2.2 - Registro das contrações do diafragma de rato	23
2.3 - Efeito da Guanidina e 4-aminoperidina	
2.4 - Efeito de antagonistas de cálcio sobre a ação da Guanidina	24
a) Dantrolene	25
b) Nifedipina	25
2.5 - Efeito da Guanidina em Diafragma Cura- rizado	25
2.6 - Curva dose-efeito da acetilcolina em Preparação Cronicamente Desnervada de Rato	26

	<u>Página</u>
3 - EFEITO DA GUANIDINA SOBRE OS BIOPOTENCIAIS .	26
3.1 - Medida do Potencial de Repouso das Fi- bras Musculares de Camundongo	26
3.2 - Registro dos Potenciais de Placa Ter- minal em Miniatura (pptm)	27
3.3 - Efeito de Guanidina sobre o potencial de ação composto de músculo diafragma de camundongo	28
4 - ESTUDO MORFOLÓGICO	28
4.1 - Microscopia Óptica	29
4.1.1 - Preparações controle	29
4.1.2 - Preparações incubadas com gua- nidina	29
4.2 - Microscopia Eletrônica	31
4.2.1 - Preparações controle	31
4.2.2 - Preparações incubadas com gua- nidina com ou sem estimulação elétrica	31
IV - DISCUSSÃO	34
V - RESUMO E CONCLUSÕES	42
VI - BIBLIOGRAFIA	74

I - INTRODUÇÃO

A guanidina ou a diamino-imino-metano ($\text{HN} = \text{C} - (\text{NH}_2)_2$) também conhecida por imino uréia é um produto do metabolismo proteico encontrado na urina e no sangue do homem e também presente no suco de nabo, beterraba, cogumelo, germê de milho, casca de arroz, mexilhão e minhoca (Costa, 1978). Por ser fortemente básica a guanidina se ioniza no pH fisiológico dando origem ao íon guanidinium que é positivo e de peso molecular igual a 59,074. Assim seu peso molecular menor do que 100, facilita sua difusão através dos poros da membrana. Através de técnicas específicas, a guanidina pode ser obtida por síntese (Smith et al., 1931; Watt, 1954).

Em 1918, Watanabe constatou que a guanidina apresenta efeito hipoglicemiante por aumento da glicólise anaeróbica, o que leva a uma maior utilização da glicose e sua diminuição no sangue. Tanto a guanidina como seus derivados por substituição revelaram-se demasiado tóxicos para serem usados em terapêutica. Das biguanidas (derivada de duas moléculas de guanidina, com eliminação de amônia) a fenformina (Ungar, Freedman & Shapiro, 1957) surge em 1957 como uma droga hipoglicemiante de utilidade terapêutica. Em 1960, Willians, demonstrou *in vitro* que a fenformina aumenta a glicólise anaeróbica, ocasionando além da hipoglicemia, a acidose lática que pode ser irreversível. Além disso é contra-indicada nas complicações de diabete: coma, cetoacidose, doença grave hepática, renal, cardiovascular e em mulhe-

res grávidas. Os efeitos colaterais que são principalmente gastro intestinais, incluem náuseas, vômitos, gosto metálico e diarréia (Duncan & Clarke, 1965; Kanneterud et al., 1971).

A soma de efeitos colaterais e contra-indicações limitou o seu uso em terapêutica e em 1975 foi proibida nos EUA.

A guanidina ainda apresenta uma ação estimulante sobre a transmissão neuromuscular, razão pela qual a droga foi experimentada no tratamento da miastenia grave que clinicamente se traduz por fadigabilidade muscular anormal ao esforço, predominando nos músculos inervados pelos nervos cranianos. Relatos anteriores (Minot Dodd & Rivens, 1939; Desmedt, 1956) indicam que alguns pacientes exibiam melhora no quadro clínico com o uso da guanidina.

Brown & Johns em 1969 relataram piora de sintomas em 3 pacientes com miastenia grave adiantada que recebiam tratamento com guanidina.

Simpson em 1960, aventou a hipótese que a miastenia grave poderia ser uma doença auto-imune em decorrência da formação de anticorpos contra a proteína receptora da placa terminal. Contudo, essa alteração pode não ocorrer em casos recentes de miastenia grave (Rash et al., 1976). Pesquisas com o emprego de a bungarotoxina radiodada mostraram que há redução no número de receptores na membrana sub sináptica capaz de justificar a diminuição da amplitude dos potenciais de placa terminal (ppt) e potenciais de placa terminal em miniatura (pptm) e o transtorno na transmissão neuromuscular (Fambrough, Drachman & Satyamurty, 1973; Ito et al., 1978). Além de outros recursos terapêuticos, a administração de drogas anticolinesterásicas reverte tempora-

riamente os sintomas da doença.

A síndrome miastênica é uma desordem neurológica (Lambert, 1966; Elmqvist & Lambert, 1968) via de regra associada com carcinoma broncogênico em 70% dos casos. Ocorre mais comumente em homens acima de 40 anos e seus sintomas se caracterizam predominantemente por fraqueza e fadigabilidade fácil dos músculos próximos aos membros, especialmente da cintura pelviana e coxas, levando à perturbação da marcha. A guanidina apresenta um efeito benéfico pronunciado em contraste aos efeitos muito limitantes dos inibidores da colinesterase.

As características eletromiográficas do efeito da transmissão neuromuscular visto na síndrome miastênica sugere que a fisiopatologia é diferente daquela vista na miastenia grave sendo por outro lado semelhante ao bloqueio neuromuscular produzido pela toxina botulínica (CHERINGTON & RYAN, 1968), magnésio e neomicina, que são substâncias conhecidas por diminuir o número dos *quanta* de acetilcolina liberada por impulso nervoso (Elmqvist & Lambert, 1968).

Kamenskaya, Elmqvist & Thesleff (1975a) usando músculo intercostal humano e músculo diafragma de camundongo confirmaram os resultados de Otsuka & Endo (1960) de que a guanidina aumenta a liberação de acetilcolina quando estímulos isolados são aplicados sobre a terminação nervosa motora.

O efeito facilitador da guanidina sobre a transmissão neuromuscular foi observado pela primeira vez por Gergens & Baumann (1876) que verificaram contrações espontâneas em músculo de rã.

Feng, em 1938, com o objetivo de contribuir para o escl-

recimento do mecanismo da transmissão neuromuscular utilizou a guanidina. Em seu trabalho, pela primeira vez, foi verificado que, sob estímulo isolado indireto, a preparação exibe respostas ou contrações múltiplas e de amplitude aumentada enquanto que sob estímulo direto o efeito é pouco significativo. Dando prosseguimento a seus estudos, em 1940, Feng trabalhou com preparação curarizada. Através de técnicas eletrofisiológicas mostrou que a guanidina induz ao aumento da amplitude dos potenciais de placa terminal (ppt) em músculo de rã parcialmente curarizado, demonstrando assim, o efeito anticurare da guanidina.

Em 1960, Otsuka & Endo usando a preparação ciático sartório de rã, demonstraram que o aumento da amplitude do ppt sob ação da guanidina se deve a uma quantidade aumentada de transmissor, e, não porque tenha ação inibidora sobre a colinesterase ou porque aumente a sensibilidade da placa terminal à acetilcolina. Esta observação foi subsequente confirmada por outros pesquisadores (Hoffmann, Parsons & Feigen, 1966; Teräväinen e Larsen, 1975 e Lundh & Thesleff, 1977). A guanidina também facilita a transmissão do impulso nervoso na junção neuromuscular de rato (Teräväinen & Larsen, 1975) e na sinapse gigante de lula (Kusano, 1970).

Ainda segundo Otsuka & Endo a guanidina não tem ação sobre o potencial de membrana e portanto, o aumento do ppt também não se deve a mudanças de parâmetros pós sinápticos. Foi sugerido que o sítio de ação da guanidina estaria localizado em pontos específicos do terminal nervoso. Esses pontos pré sinápticos teriam sua excitabilidade aumentada recrutando acetilcolina latente e assim aumentando o conteúdo quantal.

A partir desse trabalho o mecanismo pelo qual a guanidina aumenta a liberação do neurotransmissor atraiu o interesse de vários investigadores durante as 3 últimas décadas: Tasaki, Singer e Watanabe, (1965; 1966) trabalhando com axônio gigante de lula confirmaram o resultado já obtido em fibras mielinizadas de rã (Larramendi, Lorente de NÓ e Vidal, 1956; Lorente de NÓ, 1957) de que o íon sódio no processo de excitação pode ser substituído pelo cátion monovalente guanidinium entre vários outros cations nitrogenados.

Em 1976, Volle & Branisteanu trabalhando com preparação ciático sartório de rã demonstraram que a guanidina (0,5 mM) aumenta o número dos *quanta* liberados pelo potencial de ação porque aumenta a mobilização do transmissor de forma semelhante ao cálcio. A diferença entre ambos estímulos, consiste em que o cálcio aumenta a freqüência de pptm, ao passo que a guanidina (0,5 mM) não alterou esse parâmetro.

Matthews & Wickelgren (1977) sugeriram que a guanidina aumenta a amplitude do ppt através da ligação a cargas negativas fixadas na superfície externa da membrana do terminal pré sináptico. Isto causaria uma mudança nos canais de Ca voltagem sensível de tal forma que estes se abririam até com pequena despolarização da membrana. Isso levaria a um aumento do influxo de Ca^{+2} , o que resulta num aumento de liberação do transmissor.

Por outro lado Lundh & Thesleff (1977) sugeriram que a guanidina na ausência de Na^{+} extracelular age intracelularmente e mesmo não tendo efeito sobre o efluxo de potássio como o Tetraetilamonio e 4-aminopiridina (Narahashi, 1974) é capaz de produzir uma resposta elétrica possivelmente por permitir a re-

geração de uma corrente de Ca^{2+} para o interior da membrana como foi discutido por Katz & Miledi (1969). Banks em 1978 relatou aumento na duração do potencial de ação em terminais pré sinápticos de ganglio ciliar de pintainho.

Farley et al. (1979) reiteraram essa ação intracelular baseados no longo período de tempo requerido para lavagem ou retirada da guanidina da biofase, o que invalida a possibilidade de sua ligação a sítios localizados na superfície da membrana. De fato, mesmo usando-se doses de 5 mM o efeito da guanidina só se inicia cerca de 15 min. após a aplicação da droga. A demora para o aparecimento do efeito da guanidina é consistente com a hipótese de ativação de um sítio de ação intracelular (Tabti, Bourret & Mallart, 1989).

Ainda corroborando tal ação intracelular a guanidina poderia inibir a captura de cálcio pela mitocôndria ou inibir a bomba de $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$. Ambos os mecanismos foram propostos para remoção do cálcio das células (Rahamimoff & Alnaes, 1973; Blaustein, 1974).

Pressman & Park (1963); Chance & Hollunger (1963) mostraram que concentrações milimolares de guanidina inibem a respiração mitocondrial e aumentam grandemente a liberação do mediador, sem que nenhum aumento na frequência de pptm seja observado. Isto sugere que não está havendo acúmulo de cálcio dentro do terminal. Entretanto Lundh, Leander & Thesleff (1977) demonstraram que a guanidina em altas concentrações (5 mM) aumenta a frequência dos pptm até 140 por segundo, após uma latência de cerca de 1:30 h. Existem duas possibilidades ou a inibição da função mitocondrial não é o mecanismo pelo qual a guanidina

aumenta a liberação do transmissor ou este tipo de inibição ocorreria somente na presença de alta concentração de guanidina.

Em 1982, Brigant & Mallart, preconizaram um novo método de investigação sobre as correntes pré sinápticas extracelulares que fluem no perineuro entre nódulos de Ranvier vizinhos e entre os nódulos e terminal motor. A terminação motora de camundongo foi utilizada por conter a maioria dos canais iônicos já descritos em outras membranas excitáveis: canais de Na^+ (Konishi, 1985), canais de Ca^{2+} (Brigant & Mallart, 1982; Mallart, 1986; Penner & Dreyer, 1986), canais K^+ (Brigant & Mallart, 1982; Dreyer & Penner, 1987) e canais de K^+ cálcio dependente (Mallart, 1985b). Como a guanidina aumenta a liberação de acetilcolina (Otsuka & Endo, 1960) esse efeito pode se dar provavelmente em consequência de um influxo aumentado de Ca^{2+} durante o potencial de ação.

Segundo Anderson & Harvey, (1988) uma ação direta sobre os canais de Cálcio é improvável porque a guanidina produz esse mesmo efeito na ausência de Ca^{+2} externo e porque não afeta o prolongamento da corrente de Ca^{2+} (ou platô) que acontece após bloqueio da corrente de K^+ e corrente de voltagem K^+ cálcio dependente pelo TEA e 3,4 diaminopiridina.

Segundo Brigant & Mallart (1982) a corrente de repolarização principal no terminal nervoso motor em camundongos é uma corrente de K^+ voltagem dependente que farmacologicamente pode ser dividida em componentes rápido e lento.

Mallart (1985a), Penner & Dreyer (1986) confirmaram que a guanidina produz uma redução seletiva do componente associado à corrente de K^+ voltagem dependente não apresentando efeitos

significantes sobre as correntes de Na^+ , Ca^{2+} ou K^+ cálcio dependente. Esse bloqueio seletivo dos canais de K^+ no terminal nervoso causaria uma despolarização prolongada com a entrada de um grande influxo de Ca^{2+} . Isto levaria a liberação de mais acetilcolina por impulso nervoso, explicando o efeito facilitatório da guanidina cuja principal ação no terminal motor é bloquear parcialmente os canais de K^+ rápido que são responsáveis pelo potencial de ação repolarizante (Molgó & Mallart, 1988).

Em 1989, Tabti, Bourret & Mallart verificaram que a guanidina (5 - 10 mM) além de produzir um quase completo bloqueio de canais rápidos de K^+ apresenta a mesma intensidade de bloqueio sobre os canais lentos, o que aumenta a duração da repolarização e garante um maior influxo de Ca para dentro do terminal e uma maior liberação do medidor.

Rodrigues-Simioni & Prado-Franceschi (1985), verificaram que a guanidina na concentração de 10 mM exibe um efeito facilitador das contrações musculares que é seguido (em 15' - 30') de bloqueio total das respostas do músculo diafragma de camundongo a estímulos elétricos. Após a retirada da droga do contato com a preparação por lavagem observa-se uma facilitação de intensidade variável, mas que na maioria dos experimentos realizados mostrou um aumento de amplitude das contrações em geral de 150-300%. Esta observação incomum levou-nos a estudar o fenômeno com o objetivo de contribuir para o esclarecimento da ação complexa da guanidina sobre a placa mioneural. O trabalho consta de uma primeira etapa onde serão apresentados os resultados miográficos e uma segunda parte que apresenta os estudos eletrofisiológicos dos efeitos da guanidina sobre a preparação

nervo frênico diafragma de camundongo e de rato.

A partir da verificação de que substâncias e toxinas que interferem com o processo de acoplamento excitação-secreção determinam também alterações estruturais a nível de nervo e junção neuromuscular (Cruz-Höfling et al., 1983/1984; 1985 a, b, 1987; Love & Cruz-Höfling, 1986; Love et al., 1986), decidimos investigar se a guanidina exhibe também tal ação.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1 - MATERIAL

1.1 - Drogas

Utilizamos as seguintes drogas: cloreto de guanidina (Sigma-EUA); 4-aminopiridina (Sigma - EUA); dantrolene (Sigma - EUA); d-Tubocurarina (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda); iodeto de acetilcolina (Sigma - EUA); carbachol (Aldrich); nifedipina (Sigma - EUA); tetrodotoxina (Sigma - EUA).

1.2 - Animais

Para a realização do presente trabalho utilizamos camundongos albinos, machos ou fêmeas (*Mus musculus* variedade *albinus* com peso entre 18 e 35 gramas) e ratos albinos, machos e fêmeas (*Rattus rattus* variedade *wistar* com peso entre 200 e 300 gramas) fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP.

1.3 - Solução Nutritiva (Tyrode)

Concentrações em mM: NaCl - 137; KCl - 2,7; CaCl₂ - 1,8; MgCl₂ - 0,5; NaHCO₃ - 12,5; NaH₂PO₄ - 0,44; Glicose - 10,5.

2 - MÉTODOS

2.1 - Teste de Toxicidade

Determinação da DL50

A dose letal 50% (DL50) da guanidina, foi determinada pelas vias oral (Vo), intra-peritoneal (ip) e intra-venosa (iv), em camundongos (18 - 22g) empregando-se doses seriadas com razão igual a 1,5; sendo que o volume injetado por animal foi de 0,5 ml. As injeções foram feitas no peritônio (DL50 ip), na veia dorso lateral da cauda (DL50 iv) e via oral através da agulha "IBRA-CBO" ind. bras. nº 40 x 15 por nós recurvada e privada de bisel de modo a facilitar a sua introdução no estômago.

Foram utilizados lotes de 6 camundongos para cada dose, num total de 4 doses. O controle foi feito injetando-se solução salina num lote de 6 animais. Os animais eram examinados 10 minutos, 30 minutos e 24 horas após as respectivas administrações. Os valores das DL50 e respectivos limites de confiança a 95%, foram calculados segundo WEIL (1952).

2.2 - Estudo Miográfico

2.2.1 - Preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo

Foram usados camundongos de ambos os sexos e peso superior a 30 gramas. Após sacrifício do animal pela secção dos vasos do pescoço, procedeu-se à retirada e montagem do segmento de hemidiafragma esquerdo com o nervo motor correspondente, de acordo com a técnica

ca descrita por BÜLBRING (1946). Como meio nutritivo usou-se a solução de Tyrode glicosada cuja composição está mencionada em 1.3.

O volume da cuba foi de 20 ml e sua temperatura mantida constante a 37°C. Oxigenou-se a preparação pelo borbulhamento de carbogênio (95% de O₂ e 5% CO₂) no banho. A preparação foi estimulada direta e indiretamente através de seu nervo motor usando-se um estimulador Grass modelo S4. O diafragma foi mantido por sua porção tendinosa sob tensão constante (5 g) e através de um fio, ligado a um transdutor miográfico Linear Core E & F-50 acoplado a um fisiógrafo E & M modelo P.M.P. 4A, para registro das tensões produzidas pelas contrações do músculo. Empregaram-se sempre estímulos maximais no nervo usando-se os seguintes parâmetros; frequência de 0,1 Hz e duração de 0,2 m seg.

2.2.2 - Preparação nervo frênico-diafragma isolado de rato

Foram usados ratos de 250 a 300 g de peso. Após anestesia dos animais pelo hidrato de cloral (240 mg/kg por via intraperitoneal) e sangria por secção de vasos do pescoço, procedeu-se à retirada e montagem do segmento do hemidiafragma esquerdo com o nervo motor correspondente, de acordo com a técnica descrita por BÜLBRING (1946). Como meio nutritivo usou-se a solução de Tyrode glicosada, já mencionada em 1.3.

O volume da cuba foi de 30 ml e a sua temperatura mantida constante a 37°C. Oxigenou-se a preparação pelo borbulhamento de carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) no banho. As contrações do hemidiafragma foram registrados em papel esfumado de qui-

môgrafo Palmer através de pena inscritora de alavanca Starling. O nervo frênico foi colocado em eletrodos de platina e a estimulação, tanto do nervo frênico como do hemidiafragma foi feita com pulsos retangulares fornecidos por estimulador eletrônico (Grass, S4). Empregaram-se sempre estímulos maximais na excitação do nervo usando-se os seguintes parâmetros: frequência de 0,1 Hz, duração de 0,2 msec e para estímulo direto, duração 2,0 msec e 0,1 Hz.

2.2.3 - Preparação diafragma desnervado de rato

A desnervação foi feita pela secção do nervo frênico esquerdo, em ratos de 250 a 280 g, anestesiados pelo éter etílico segundo técnica descrita por VITAL BRAZIL (1965). Colocou-se o animal em decúbito lateral direito, fazendo-se uma incisão de 1,5 a 3 cm, perpendicular à linha mediana no terço inferior da região lateral do tórax esquerdo previamente depilada. A incisão atravessou a pele e a camada muscular delgada que recobre esta região. Ao longo de um espaço intercostal, em uma extensão de 1 a 2 cm, cortaram-se com tesoura os músculos intercostais. Usando-se bastão de vidro com extremidade recurvada, pinçou-se o nervo frênico da parede interna do tórax tracionando-o para as bordas da incisão, onde era seccionado. Em seguida, suturava-se apenas a pele por meio de dois ou três pontos conforme a extensão da ferida. Decorridos 15 a 25 dias, retirava-se o segmento em leque do hemidiafragma esquerdo e montava-se a preparação, segundo técnica adotada no caso anterior, para solução nutritiva, volume e temperatura do banho, assim como o processo de registro das contrações.

2.3 - Registro intracelular

2.3.1 - Preparação frênico-diafragma isolado de camundongo

Utilizaram-se camundongos de 18 a 25 g cujo hemidiafragma esquerdo foi retirado com um segmento do nervo frênico correspondente, segundo técnica já descrita. O músculo era estendido e fixado com sua face torácica voltada para cima no fundo de uma cuba de perspex com 3 cm de comprimento, 1,8 cm de largura e 0,8 cm de profundidade através de alfinetes apropriados. A cuba era preenchida com 2 ml de solução nutritiva Tyrode glicosado de composição como a citada para a preparação do item 3.2. A oxigenação da preparação foi feita pelo borbulhamento de carbogênio. O banho foi mantido à temperatura ambiente (25 ± 3)°C. Os potenciais bioelétricos da placa motora eram captados através de microeletrodos (Me) de vidro preenchidos com solução de KCl 3 M e de resistência compreendida entre 15-25 MΩ. Eram preparados no próprio laboratório e usados no mesmo dia. Para sua confecção utilizaram-se túbulos de vidro apropriado e um esticador de microeletrodos (David Kopf Instruments Tujunga, California - USA).

2.3.2 - Medida de Biopotenciais

a) Potencial de repouso (PR)

A preparação foi mantida sob estímulo indireto só interrompido para as respectivas leituras. A guanidina foi adicionada ao banho na concentração de 10 mM fazendo-se a medida do po-

tencial de repouso nos tempos de 15, 30 e 60 minutos. Imediatamente após procedia-se a lavagem da preparação por 3 vezes consecutivas e em seguida novos registros eram tomados durante os mesmos intervalos de tempo já citados. Em alguns experimentos usando-se a mesma técnica anterior para registro de PR foi obedecido o seguinte protocolo: medida do PR controle; adição de carbacol (20 µg) ao banho, leitura nos tempos de 15 e 30 minutos, lavagem. Na vigência do bloqueio induzido pela guanidina dentro do período de 30 minutos adicionou-se novamente carbacol (20 µg). Em seguida após as medidas tomadas aos 15 e 30 minutos lavou-se a preparação e novas medidas do PR foram tomadas 15 e 30 minutos após a substituição da solução nutritiva. A comparação entre as médias foi feita através de Teste T Student. Para $P \leq 0,5$.

b) Potencial de placa terminal em miniatura (pptm)

A guanidina 10 mM foi adicionada ao banho e a preparação foi mantida sob estímulo elétrico só interrompido para a respectiva leitura. Ao fim de 60 minutos procedeu-se a lavagem. Os potenciais espontâneos foram registrados em controle, em presença de guanidina e após lavagem. Em alguns experimentos, a guanidina foi ensaiada usando-se a Tetrodotoxina (TTX 0,5 µg/ml) desde o registro controle ou somente após lavagem.

No decorrer do experimento acima, os biopotenciais fixados na tela do osciloscópio 5113 DUAL-BEAM TEKTRONIX foram fotografados usando-se uma câmara fotográfica Polaróide C-50 TEKTRONIX.

c) Potencial de ação composto do músculo (PA)

Em alguns músculos foi registrado o potencial de ação composto do músculo evocado por estímulo elétrico indireto (0,2 msec de duração e 0,1 Hz de frequência) e em presença de guanidina (10 mM), nos tempos de 15, 30, 45 e 125 minutos. Os potenciais captados através de eletrodo extracelular de platina foram fotografados usando câmara fotográfica Polaróide C-5C Tektronix.

2.4 - Estudo Morfológico

Preparação nervo-músculo diafragma de camundongo — animais com peso superior a 30 g foram sacrificados pela secção dos vasos do pescoço e a preparação nervo-músculo diafragma foi montada de acordo com técnica anteriormente descrita no item 2.2.1.

Os experimentos obedeceram aos seguintes protocolos:

1) controle

- a) diafragmas distendidos em placa de Petri, sob arejamento (carbogênio) permaneceram durante 60 minutos em solução de Tyrode, à temperatura ambiente (25°C).
- b) preparação montada para registro da força de contração muscular, sob estímulos elétricos maximais, 0,5 Hz de frequência e 0,2 msec de duração durante 60 minutos.

2) diafragma nas condições citadas em a) foram incubados com solução de guanidina (10 mM) em Tyrode e arejados com carbogênio durante 60 minutos em repouso (ausência de estimulação elétrica).

3) preparação montada segundo as condições descritas em b), porém incubada com guanidina e submetida a estímulos maximais, para registro da força de contração muscular.

Após 15 minutos da retirada da guanidina do banho através de três lavagens consecutivas, o registro foi interrompido e as preparações foram fixadas para estudo morfológico.

Seguindo o tratamento acima, os fragmentos do músculo foram preparados para a observação ao microscópio óptico e eletrônico, com o objetivo de verificar se as alterações fisiológicas registradas são acompanhadas por alterações morfológicas. Após os tempos previstos, as soluções de incubação foram sendo gradualmente substituídas pela solução fixadora que continha glutaraldeído a 3% a (v/v) e paraformaldeído a 1% (p/v), em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2 a 7.4 (Karnovsky, 1965). A seguir, sob lupa, o diafragma após pré-fixação foi transferido para uma placa de cera e sobre ela foi vertida a solução fixadora. Nessas condições, o diafragma foi recortado nos locais adjacentes ao trajeto do nervo frênico em fragmentos de 1 a 2 mm. Após fixação na solução de Karnovsky, a 4°C por pelo menos 24 h, os fragmentos foram pós-fixados em OsO₄ a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e corados em bloco em solução alcoólica de acetato de uranila 0,5% durante a noite a 4°C. Após desidratação em etanol, os fragmentos foram incluídos em Epon 812. Os blocos contendo o material foram cortados em ultramicrotomo Porter-Blum MT 2; com navalhas de vidro. Foram feitas secções de 1 µm que foram coradas com azul de toluidina para microscopia óptica, e, secções ultrafinas, que foram contrastadas

com citrato de chumbo para microscopia eletrônica (microscópio Zeiss EM 9S2).

Concomitantemente, foram coletadas preparações que foram fixadas em solução de Bouin e tratadas rotineiramente para obtenção de cortes histológicos (5 - 7) μm), incluídos em parafina. Foram feitas colorações com hematoxilina-eosina, que juntamente com as secções plásticas de 1 μm , coradas com azul de toluidina, destinavam-se ao estudo do aspecto histológico do músculo. As secções de 1 μm , serviram também para selecionar as áreas que continham junção neuromuscular, que seriam cortadas para a microscopia eletrônica.

III - RESULTADOS

1 - TOXICIDADE DA GUANIDINA

A Tabela I mostra o valor da DL50 (mg/kg) para a droga em estudo, usando-se diferentes vias de administração.

Os sinais exibidos pelos animais após a administração oral, intraperitoneal e intravenosa, apresentaram a seguinte seqüência de aparecimento: agitação com aumento crescente da movimentação até chegar a saltos repetitivos; com auxílio das patas coxa focinho repetidamente; reação de ataque ao toque; contração diafragmática dando "solução" com dispnéia; exoftalmia, cianose das extremidades; movimentação diminuída; prostração; paralisia espástica do trem posterior; diminuição dos movimentos respiratório culminando com apnéia, convulsão e morte.

2 - EFEITO DA GUANIDINA EM PREPARAÇÃO

NERVO-FRÊNICO-ISOLADO DE CAMUNDONGO E RATO

2.1 - Registro da Força de Contração do diafragma de camundongo

Em 15 experiências a adição de guanidina (10 mM) determinou inicialmente um aumento da amplitude das contrações musculares em resposta e estímulos elétricos isolados aplicados no nervo motor (150% em relação ao controle) seguido de bloqueio da transmissão neuromuscular. Após três substituições consec-

tivas da solução nutritiva observou-se novo aumento da ordem de 3,5 vezes (350%) a amplitude controle. As figuras 1 e 2 exibem o efeito típico da ação trifásica da guanidina: facilitação primária; bloqueio e facilitação secundária.

O efeito facilitador primário induzido pela guanidina após em média 30 minutos de contato ocorre num intervalo de tempo entre 15 e 30 minutos. De forma semelhante a facilitação secundária atinge seu ponto de equilíbrio e perdura em média por 30 minutos após o que observa-se o declínio da amplitude das respostas musculares até níveis controle após 120 a 140 minutos (Fig. 2).

Além dos efeitos acima descritos variando-se a velocidade do fisiógrafo aparece um visível retardo no tempo de relaxamento do músculo como se houvessem duas contrações musculares (Fig. 3). Na vigência de estímulo direto observou-se o mesmo resultado embora neste caso o efeito tenha se mostrado menos regular e marcante (Fig. 4). Ainda após a facilitação secundária houve o declínio da amplitude de contração muscular até atingir a amplitude controle (embora não ilustrado).

2.2 - Registro das Contrações do Diafragma de rato

A Figura 5 mostra o efeito da guanidina (10 mM) na mesma preparação, mas em rato. Obteve-se em princípio o mesmo resultado que em camundongo. Além disso observou-se que a preparação responde à estimulação tetanizante (70 Hz) com tétano perfeito que traduz a integridade dos mecanismos envolvidos no processo de transmissão neuromuscular. Por outro lado exhibe ausência de facilitação pós-tetânica comportamento que é típico de substân-

cia bloqueadora da junção neuromuscular por despolarização. A dose de 1 mM exibe somente seu efeito facilitador (Fig. 6).

2.3 - Efeito da Guanidina e 4-aminopiridina

Quatro aminopiridina nas doses de 10, 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$ foram submetidas a protocolo semelhante àquele usado para guanidina. Observou-se uma facilitação inicial das contrações, as quais após 80 minutos, retornaram a amplitude controle ($n = 7$) (Fig. 7). Nem o bloqueio, nem a facilitação pós lavagem foram observados nas doses utilizadas.

Em outro grupo de experiência ($n = 3$) em que a guanidina foi adicionada antes da 4-AP (Fig. 8) a guanidina exibiu comportamento semelhante ao já descrito ou seja, facilitação seguida de bloqueio não são revertido pela lavagem como seguido de amplitude superior (172%) ao controle.

Em oito experiências a guanidina (10 mM) foi adicionada ao banho após a 4-AP, no momento em que o efeito facilitador da transmissão neuromuscular já se encontrava em equilíbrio. Nesse caso, a guanidina determinou imediato e progressivo bloqueio num período de, em média, 50 minutos. Após a lavagem da preparação conservando-se ou não a 4-AP na solução nutritiva observou-se o efeito facilitador secundário (pós-lavagem) típico da guanidina (Fig. 9). Portanto, somente a facilitação inicial induzida pela guanidina foi inibida pela 4-AP.

2.4 - Efeito de Antagonistas de Cálcio sobre a ação da Guanidina (10 mM)

a) Dantrolene

Em quatro experiências, após a instalação do bloqueio parcial devido ao tratamento da preparação com dantrolene (5 µg/ml) e atingido o equilíbrio (60') adicionou-se a guanidina (10 mM). Observou-se a reversão parcial do bloqueio neuromuscular, seguida de bloqueio mais intenso e após lavagem obteve-se a volta da amplitude das respostas musculares a níveis superiores ao controle, como é típico para a guanidina (Fig. 10).

b) Nifedipina

A nifedipina (2 µM) não impediu o bloqueio nem a facilitação secundária induzidos pela guanidina (Fig. 11). Somente a facilitação inicial (primária) deixou de ser observada como acontece sempre que a guanidina é ensaiada após drogas facilitadoras da transmissão neuromuscular (4-AP, nifedipina).

2.5 - Efeito da Guanidina (10 mM) em Diafragma Curarizado

Com o objetivo de verificar a contribuição de uma possível ação pré-juncional da guanidina em seus efeitos típicos, preparações foram curarizadas, com dose elevada de d-Tc (10 µg/ml) e mantidas sob estímulos maximais, (0,1 Hz e 2 mseg) aplicados diretamente no músculo. Como mostra a Figura 12 somente o

efeito facilitador primário surgiu em resposta à adição da guanidina ao banho. Não se observou o bloqueio e nem mesmo a facilitação secundária após sucessivas lavagens. Tal procedimento determinou somente a volta da amplitude das respostas musculares a níveis controle.

2.6 - Curva dose-efeito da acetilcolina em preparação cronicamente desnervada de rato

A curva dose-resposta da acetilcolina nesta preparação em presença de duas doses de guanidina (10 mM, 20 mM) ilustrada na Figura 13 mostra o deslocamento da curva para a direita com a menor dose. A retirada da guanidina do banho determina a reversão parcial do bloqueio. Com dose duas vezes maior obteve-se uma curva em sino característico do fenômeno de auto-inibição, além da ausência da reversão do bloqueio após lavagem. Estes resultados apóiam a hipótese de que além de um efeito pré sináptico a guanidina exiba também um efeito inibitório muscular, não específico.

3 - EFEITO DA GUANIDINA SOBRE OS BIPOTENCIAIS

3.1 - Medida do Potencial de Repouso das Fibras Musculares de Camundongo

A Tabela II mostra que a guanidina (10 mM) não altera o potencial de repouso nas fibras musculares de modo significante

apresentando uma discreta flutuação, em torno de 68 a 74 mV tanto nos primeiros 60 minutos de contato como na pós-lavagem. Os dados obtidos foram lançados em gráfico (Fig. 14).

O efeito despolarizante do carbacol (20 µg/ml) (agonista nicotínico) em presença da guanidina (10 mM) foi mensurado através da medida do PR.

O exame da Tabela III mostra que o carbacol despolariza a membrana da fibra muscular com a mesma intensidade na ausência ou em presença de guanidina. Os dados obtidos foram lançados em gráfico (Fig. 15).

3.2 - Registro dos Potenciais de Placa

Terminal em Miniatura (pptm)

Verificou-se que em algumas fibras a guanidina (10 mM) determina um marcante aumento na frequência dos pptm. Após lavagem observou-se uma descarga intensa desses biopotenciais concomitantemente com a facilitação da transmissão neuromuscular já descrita.

Além disso, observa-se fibrilação generalizada ao mesmo tempo em que podem ser registrados potenciais de 3 mV de amplitude. A Figura 16 ilustra o efeito da guanidina sobre as características dos pptm em 5 experiências. A Figura 17 ilustra em forma de histograma o número de pptm antes da adição de guanidina e na vigência do seu efeito pós-lavagem.

Na Figura 18 observamos que após incubação da preparação (tetrodotoxina 0,5 µg/ml) a adição de guanidina ainda aumenta a frequência dos pptm. No entanto, a usual descarga dos pptm após

retirada da guanidina por lavagens consecutivas não está presente, sugerindo uma inibição da facilitação secundária pela TTX.

A Figura 19 mostra os resultados obtidos quando um protocolo inverso foi adotado, ou seja, a TTX foi adicionada na vigência das descargas dos potenciais espontâneos. Observou-se o desaparecimento das descargas permanecendo tão somente a alta frequência dos mepps.

3.3 - Efeito da Guanidina sobre o Potencial de Ação Composto do Músculo Diafragma de Camundongo

A Figura 20 mostra o aumento da duração do potencial de ação assim como o aparecimento de potenciais repetitivos em resposta a um único estímulo.

4 - ESTUDO MORFOLÓGICO

O registro da força de contração muscular foi interrompido aos 15 minutos após lavagem, ou seja, quando a facilitação secundária atinge um estado de equilíbrio, e neste ponto efetuou-se a fixação do músculo para estudo morfológico.

4.1 - Microscopia Óptica

4.1.1 - Preparações controle (incubadas com solução de Tyrode)

As observações foram efetuadas em cortes corados com hematoxilina-eosina e corados com azul de toluidina.

Os músculos (diafragmas) incubados com solução de Tyrode mostraram nas preparações histológicas, fibras musculares levemente arredondadas ou poligonais, com contornos regulares. A arquitetura do sistema miofibrilar mostrou aparência normal, com estriações características de músculos esqueléticos, observados nas fibras cortadas longitudinalmente. Aparentemente, a localização e o aspecto dos núcleos estavam corretos, com cromatina frouxa e regiões de heterocromatina junto à membrana nuclear. Não foram registradas alterações intersticiais. Uma constatação frequente foi a justaposição das fibras muitas vezes não deixando espaços intercelulares visíveis.

Os músculos incubados com Tyrode, porém com estimulação elétrica, mostraram aspecto basicamente semelhante àquele descrito para o grupo anterior (Fig. 21). Como naqueles, as fibras musculares mostraram-se com forma, dimensões, aspecto e coloração normais. As fibras musculares, diferentemente dos não estimulados eletricamente estavam mais separadas tornando patente os espaços intercelulares.

4.1.2 - Preparações incubadas com guanidina

A maneira do grupo controle, este grupo teve preparações

estimuladas e não estimuladas eletricamente.

As fibras musculares com aparência normal pareciam estar em maior número do que as fibras anormais. Estas últimas mostravam-se heterogêneas na cor e dimensões. Ao lado de fibras musculares tumefatas foram encontradas fibras de tamanho muito reduzido. Adicionalmente muitas fibras anormais mostravam microvacúolos, digestão parcial, ou zonas irregulares intensamente coradas. Estas pareciam ser zonas de hipercontração muscular.

Quanto ao grupo de preparações que foram incubadas com guanidina sob estímulo elétrico das lâminas histológicas revelaram fibras musculares com fragmentação focal, especialmente na região sub-sarcolemal (Figs. 22 e 23). Outras fibras mostraram desorganização da arquitetura miofibrilar e o sarcoplasma com aspecto claro e finamente granular. Em algumas fibras musculares foi observada alternância de manchas claras e escuras juntamente com a presença de pequenos e médios vacúolos. As vezes, os cortes dos fragmentos do diafragma mostravam faixas extensas de franca mionecrose. Nesses locais, com certa freqüência havia casos extremos de fibras necróticas onde estava representado somente o contorno da fibra, isto é, o sarcoplasma fora completamente digerido restando apenas o envoltório sarcolemal e o núcleo da fibra (Fig. 25). Nas lâminas coradas com H.E., em cortes longitudinais, as estriações estavam ausentes em algumas fibras, e havia regiões mais acidófilas. Em uma ou outra fibra identificavam-se zonas de hipercontração.

4.2 - Microscopia Eletrônica

4.2.1 - Preparações controle (incubadas com solução de Tyrode)

Dentro das condições descritas para o meio de incubação, as preparações: nervo-frênico-diafragma apresentavam-se com a estrutura conhecida da junção neuromuscular (Fig. 22). Da mesma forma os fascículos nervosos intra-musculares tinham aspectos e dimensões que não denotavam anormalidade. Os axônios apresentavam axoplasma íntegro com as mitocôndrias, os neurofilamentos e microtúbulos bem distribuídos e com aspecto normal. O mesmo foi observado para a bainha de mielina. Também a célula de Schwann não denotou alterações morfológicas visíveis. Corroborando as observações feitas ao microscópico óptico, o aspecto morfológico ultraestrutural do tecido muscular estava normal, incluindo a disposição dos miofilamentos, formando as bandas A e I do sarcômero, o aspecto mitocondrial e do retículo sarcoplasmático. Também não foram constatadas anormalidades no tecido conjuntivo e vasos intersticiais.

Não se observou alteração desse quadro tanto no grupo controle estimulado, como no não estimulado.

4.2.2 - Preparações incubadas com guanidina com ou sem estimulação elétrica

A alteração que mais chamava a atenção dizia respeito ao aspecto tumefato arredondado dos terminais axônicos pré-sinápticos (Fig. 24). Aliado a isso a constatação da presença de um

número de mitocôndrias com morfologia anormal era um aspecto freqüentemente encontrado. As mitocôndrias mostravam-se hipertrofiadas, ou seja, inchadas com contornos arredondados, poucas cristas com traçado incomum e matriz eletrólucida, ocupando grande parte do espaço axoplásmico. Com relação às vesículas sinápticas, o seu aspecto e tamanho apresentavam-se aparentemente dentro dos padrões normais. Entretanto, embora não se tenha feito uma avaliação morfométrica, há indícios de que seu número esteja um pouco diminuído em relação ao observado nas preparações incubadas com solução de Tyrode. Também quanto à sua distribuição dentro do axônio terminal havia tendência a formarem agrupamentos, perdendo por vezes a posição típica junto aos chamados sítios de Pécot — Dechavassine. Algumas vesículas sinápticas com tamanho maior do que o normal também foram observadas (Fig. 25). O axoplasma mostrava-se bastante eletrólucida, com aspecto "lavado". Microtúbulos e neurofilamentos foram observados dentro dos terminais nervosos em um número aparentemente maior do que o usualmente observado nesses locais. Os terminais encaixavam-se em goteiras rasas e na grande maioria pequenas (Fig. 24) assemelhando-se a um botão apenas semi-encaixado na goteira sub sináptica, aflorando por vezes mais da metade do seu volume acima do nível do músculo.

As dobras juncionais do sarcolema, no lado sub sináptico tendiam a ser curtas e pouco numerosas.

A lâmina basal foi encontrada entre as porções pré e sub sinápticas avançando junto com as dobras juncionais como usualmente ocorre. O sarcoplasma de alguns terminais nervosos mostrava-se pouco desenvolvido estendendo-se um pouco além dos li-

mites da junção neuromuscular. As mitocôndrias do sarcoplasma juncional apresentavam-se tumefatas com tamanhos maiores do que os encontrados naquelas das preparações controle. A matriz mitocondrial era eletrólucida, e embora as cristas fossem numerosas, mostravam o arranjo espacial anormal. O aspecto das mitocôndrias era normal em muitas fibras musculares, notadamente em locais de ausência das junções neuromusculares. Entretanto, em fibras musculares em processo de necrose, mostravam anormalidades morfológicas.

Recoberto cada terminal nervoso observavam-se os processos citoplasmáticos das células de Schwann, que por sua vez estavam recobertos com a lâmina basal. Os fascículos nervosos intra-musculares também apresentavam aspectos degenerativos representados pela formação de vacúolos intra-axonais, que restringiam a área ocupada pela axoplasma. As mitocôndrias intra-axonais claramente mostravam sinais de alterações como as já descritas para os terminais nervosos. Os aspectos mionecróticos da fibra muscular podem ser observados ao nível da microscopia eletrônica na Figura 26.

IV - DISCUSSÃO

Os resultados mais relevantes apresentados neste trabalho mostram que o efeito facilitatório primário se deve ao aumento da duração do potencial de ação que pode ser causado por uma redução na condutância de potássio.

De fato a guanidina tem sido classicamente agrupada entre drogas que determinam a facilitação da transmissão neuromuscular como o tetraetilamônio (Hille, 1967) e 4-aminopiridina (Pelhate & Pichon, 1974) conhecidos agentes bloqueadores de canal de K^+ .

Nossa observação de que o efeito facilitatório primário da guanidina está ausente em preparações tratadas previamente com 4-AP assim como o efeito facilitador da 4-AP desaparece em preparações tratadas previamente com guanidina sugerem que elas atuem por mecanismos semelhantes.

Além disso a facilitação primária ocorre mesmo em presença de tetrodotoxina (TTX), tendo sido detectada através do registro do aumento de frequência dos pptom.

A proposta mais recente para explicar a ação facilitatória da guanidina apresentada por Molgõ & Mallart (1988) baseia-se em sua capacidade bloqueadora de corrente de K^+ nas mesmas doses utilizadas no presente trabalho.

Entretanto a ação facilitatória primária da guanidina ligada a seu efeito pré-juncional e que pode ser ocasionada por uma redução na condutância de K^+ , poderia também ser explicada por um retardo na inativação do canal de Na^+ , ou pela

combinação de ambos os efeitos (Tabti, Bourret e Mallart, 1989).

Embora o aumento da frequência dos pptm pela guanidina tenha sido referido apenas por Lundh, Leander e Thesleff (1977) em todos os nossos experimentos ligados ao registro desse biopotencial a adição de guanidina (10 mM) ao banho que contém a preparação isolada, determinou aumento imediato da frequência, o que fala a favor de uma ação pré-juncional provavelmente devido a uma maior disponibilidade de cálcio no terminal. Com a retirada da guanidina por lavagem houve um exacerbado aumento da frequência desses potenciais espontâneos indicando que além do bloqueio de canal de K^+ a guanidina atuaria também através da inibição de inativação dos canais de Na^+ ou mesmo por ambos os processos, conforme já referido. Esses dois mecanismos podem ser responsabilizados, pelo aumento na duração do potencial de ação, por nós registrado, sugerindo que o mesmo fenômeno ocorra a nível pré-sináptico (Kamenskaya, Elmqvist e Thesleff, 1975a). Além disso a inibição da inativação dos canais de Na^+ , explicaria o aparecimento dos potenciais iterativos.

Potenciais repetitivos em resposta a um único estímulo foram também observados por Marois & Edwards (1969) em músculo sartório de rã. Segundo estes autores a guanidina atuaria devido ao deslocamento do Ca^{2+} da membrana dos terminais nervosos resultando numa diminuição da estabilidade da membrana. Por outro lado, Matthews & Wickelgren (1977) trabalhando com axônios gigantes (axônios de Müller) de medula espinhal de lampréia, observaram efeito estimulante sobre a excitabilidade da membrana axonal através do registro de potenciais repetitivos espontâneos em resposta a estímulo isolado. Esses autores sugeriram que

a guanidina mesmo sendo um cátion monovalente e portanto menos eficiente que cátions divalentes para reduzir o efeito eletrostático de cargas negativas (D'Arrigo, 1973; Hille, Woodhull e Shapiro, 1975) acabaria por interferir no potencial elétrico propiciando condições de maior excitabilidade.

No mesmo sentido o aparecimento de pós-contração denota um visível retardo no relaxamento muscular que poderia ser causado pela inibição da corrente de inativação do canal de sódio. Tal efeito é visível somente na vigência da facilitação secundária da guanidina após lavagem.

A capacidade dessa substância em atravessar o canal de sódio (Hille, 1971; Cahalan & Begenisich, 1976; Campbell, 1976) ao mesmo tempo que fica impedida de retornar ao compartimento extracelular pela seletividade da bomba de Na^+ que não a reconhece (Keynes, 1979) poderia explicar a sua ação irreversível referida por Lundh, Leander & Thesleff, 1977 e também a exacerbada facilitação da transmissão neuromuscular após sua retirada do controle da preparação. De fato, em presença de tetrodotoxina (TTX) a facilitação secundária representada pela efetiva descarga dos potenciais em miniatura após a retirada da guanidina por lavagem está ausente. Estes resultados sugerem fortemente que esta ação da guanidina se deva a mecanismo pré sináptico possivelmente envolvendo a inativação dos canais de Na^+ . Tal suposição é apoiada pelos resultados obtidos em preparações curarizadas, sob estímulo direto, onde a guanidina foi incapaz de manifestar a sua ação facilitatória secundária característica da pós-lavagem.

Em animais desnervados a curva dose-efeito de acetilcolí-

na em presença de guanidina mostrou que após a lavagem da preparação não se observa o deslocamento da curva para a esquerda, tanto para a dose de 10 mM como para a de 20 mM. A não confirmação da ação facilitatória secundária em preparação desnervada indica que tal efeito se dá por mecanismo pré sináptico.

Além disso a guanidina potencia marcadamente a ação de veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* na junção neuromuscular (dados não publicados) cuja ação se dá pela ativação dos canais de sódio (Fontana & Vital Brasil, 1985).

Assumindo que sob a ação da guanidina a concentração intracelular de cálcio no terminal nervoso está aumentada e que a Nifedipina bloqueia canal de cálcio, é esperado, como vimos em nossos experimentos, o não aparecimento do efeito facilitatório primário, embora o efeito facilitatório secundário esteja presente, por envolver mecanismo diferente, sódio dependente, ou seja, envolvendo canal de sódio. Outro fato a ser lembrado é que a concentração usada de Nifedipina possa ter sido insuficiente para bloquear todos os canais de cálcio. Experimentos com dantrolene, conhecido bloqueador de cálcio a nível muscular, mostram que a guanidina independente da ação pre sináptica apresenta uma ação direta sobre o músculo por mecanismo não esclarecido neste trabalho. Tanto o dantrolene como a Nifedipina foram utilizados em doses próximas a sua DE50 (Fontana, Souza e Noto, 1990).

Quando a preparação nervo frênico diafragma de rato foi submetida a estímulo tetanizante, a ausência de facilitação pós-tetânica e resposta tetânica mantida poderiam sugerir que a guanidina agiria como um agente bloqueador por despolarização.

No entanto, as medidas de potencial de repouso em presença de guanidina tanto antes como pós-lavagem, isto é, durante a facilitação primária e secundária ficaram dentro de uma faixa que variou entre - 68 a - 74mV. E porque também não altera a ação despolarizante do carbacol, podemos afirmar que a guanidina não interfere especificamente com o receptor nicotínico.

As alterações induzidas pela guanidina na concentração de 10 mM, por 60 minutos, referem-se principalmente à formação de vacúolos intra-axonais nos nervos dos fascículos intra-musculares, que parecem ser decorrentes da acumulação do fluido no espaço da lamela mais interna da bainha de mielina dos segmentos inter-nodais. Além disso, as mitocôndrias axonais, assim como as presentes nos terminais nervosos, apresentavam-se em geral tumefatas, e com aspectos degenerativos. Adicionalmente os nervos mostravam-se também edematosos, bem como as terminações nervosas. Aliada a essas alterações, outras mudanças observadas foram: diminuição do número de vesículas sinápticas, aumento do número de microtúbulos e neurofilamentos e desorganização das dobras juncionais do sarcolema.

Em 1918, Watanabe faz referência a guanidina como um inibidor da respiração mitocondrial, o que foi demonstrado por Pressman & Park (1963), Chance & Hollunger (1963), utilizando concentrações milimolares. Davidoff (1974) sugere que a guanidina inibe a enzima transportadora de Ca^{2+} da membrana mitocondrial. As mitocôndrias funcionariam como sistemas tampões, responsáveis pela manutenção da homeostase do cálcio citosólico.

Segundo Rahamimoff & Alnaes, 1973; Blaustein, 1974; a captura de cálcio pela mitocôndria é um dos mecanismos propostos

para a remoção do cálcio das células. Segundo Publicover et al., 1978 quando uma concentração aumentada de cálcio extracelular está presente, inicialmente este cálcio é capturado pelas mitocôndrias, que se tornam bastante dilatadas, principalmente ampliando o espaço da matriz.

Segundo Wrogemann & Pena (1976), as mitocôndrias sobrecarregadas com cálcio começam a apresentar falha no suprimento de ATP, o que determinaria lesão no sarcolema.

As mitocôndrias dilatadas começam imediatamente a liberar o cálcio e passam para uma forma distorcida com redução do seu volume.

Por outro lado, há consideráveis evidências de que as lesões musculares ultra-estruturais induzidas, tanto patológica como experimentalmente estão associadas à concentração de cálcio. Acredita-se, por seu turno, que a sobrecarga de cálcio na mitocôndria leva a sua liberação e conseqüente ativação de proteases cálcio-dependentes, que atuam em pH neutro, e estão presentes no mioplasma, as quais destruiriam a organização miofibrilar (Publicover, Duncan & Smith, 1978).

Adicionalmente, estruturas membranosas como as mitocôndrias também podem estar distendidas por ação direta ou indireta de maior concentração de sódio dentro dos terminais nervosos. Carafoli et al. (1974) verificaram que o cálcio mitocondrial pode ser liberado destas organelas por aumento do sódio intracelular.

Wayne Moore et al. (1986) obtiveram alterações ultra-estruturais causadas pela batracotoxina (BTX), que correspondem as observadas com a administração intra-neural dos venenos dos

escorpiões *Leiurus quinquestriatus* e *Centruroides sculpturatus* e da aranha *P. nigriventer*, que atrasam a inativação ou ativam os canais de sódio voltagem dependentes (Cruz-Höfling et al., 1985b; Love & Cruz Höfling, 1986; Love, Cruz Hofling & Duchon, 1986).

Em nossos experimentos o aumento da concentração intracelular de cálcio em presença de guanidina ocorre provavelmente por dois mecanismos: em primeiro lugar por bloqueio de canal de K^+ (Molgó & Mallart, 1988) que ao prolongar o tempo de repolarização leva a um maior influxo de cálcio para o espaço intracelular e em segundo lugar por retardo da inativação dos canais de sódio, o que também concorre para o aumento da duração do potencial de ação e conseqüentemente maior influxo de cálcio. A concentração intracelular de sódio também está aumentada pelo mecanismo descrito acima, ou seja, por inibição da inativação dos canais de sódio pela guanidina.

Sob a ação da guanidina, a presença persistente tanto do cálcio como do sódio no interior da célula, concorreria para desorganizar o processo de acoplamento excitação liberação, excitação contração, determinando as alterações morfológicas a nível de terminal nervoso e músculo mostradas neste trabalho.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de esclarecer o mecanismo pelo qual a guanidina interfere com a transmissão neuromuscular estudaram-se os seguintes aspectos do fenômeno: ação pré-juncional — sugerida pela facilitação inicial que também está presente na ação da 4-aminopiridina, indicando fortemente um mesmo mecanismo de ação para ambas, ou seja, bloqueio de canal de K dependente de voltagem; tal sugestão é apoiada pelo retardo da fase de relaxamento determinada pela guanidina; pelo aumento na frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm) reforçando a hipótese de uma ação a nível de terminal nervoso.

Além disso, a guanidina aumenta a frequência dos pptm mesmo em preparações previamente incubada com TTX (0,5 g/ml). No entanto, a usual descarga do pptm após lavagem, consequente a retirada da guanidina está ausente na vigência de TTX. Ação pós-juncional: os estudos em músculo curarizado e cronicamente desnervado em presença de guanidina 10 mM induziu aumento na amplitude de resposta a estímulo direto e ausência de facilitação pós-lavagem. Além disso a curva dose-efeito da acetilcolina exibiu um bloqueio não competitivo em presença de guanidina (10 - 20 mM). O efeito despolarizante do carbacol sobre a membrana pré sináptica não foi afetado pela guanidina.

Os resultados mostraram que:

- 1º - A guanidina não atua através da interação com receptores nicotínicos;
- 2º - a facilitação inicial ocorre por mecanismo semelhante ao da 4-aminopiridina;
- 3º - o bloqueio provavelmente é determinado por ação pós-juncional inespecífica;
- 4º - a facilitação secundária se dá por mecanismo distinto da facilitação primária, possivelmente por inibição da inativação do canal de sódio;
- 5º - a guanidina determina alterações morfológicas, sendo o cálcio o principal envolvido na gênese das alterações mio-necróticas e a nível de terminal nervoso.

TABELA I

Valores de DL50 da guanidina por diferentes vias de administração e seus limites a nível de 95%.

VIAS DE ADMINISTRAÇÃO	DL50 (mg/KG)
VIA VENOSA	346 (275 a 435,5)
VIA I.P.	387,5 (346 a 435,5)
VIA ORAL	625 (400 a 840)

I

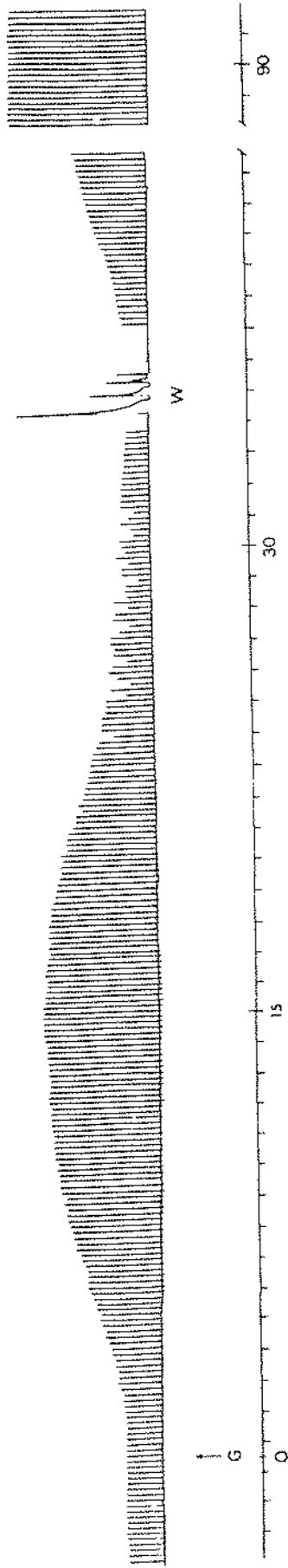


Figura 1 - Registro da força de contração muscular da preparação nervo frênico diafragma isolado de camundongo, sob estímulo indireto (0,2 mseg, 0,1 Hz). Notar o efeito típico da ação trifásica da guanidina: facilitação primária, bloqueio parcial, facilitação secundária após lavagem. Em G, guanidina 10 mM. Em W, lavagem da preparação. Na escala de tempo cada divisão corresponde a 1 minuto. A barra vertical representa a tensão de 2 g/cm.

I

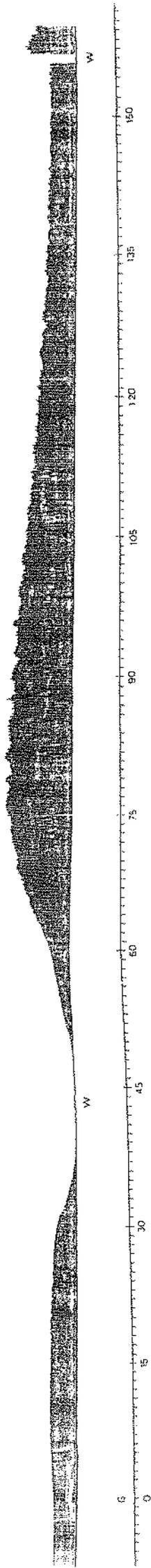


Figura 2 - Registro da força de contração muscular da preparação nervo-frênico diafragma isolado de camundongo sob estímulo indireto (0,2 mseg, 0,1 Hz). Notar o declínio da amplitude das respostas musculares até níveis controle. Em G, guanidina, em W, lavagem de preparação. A barra vertical representa a tensão de 2 g/cm.

I

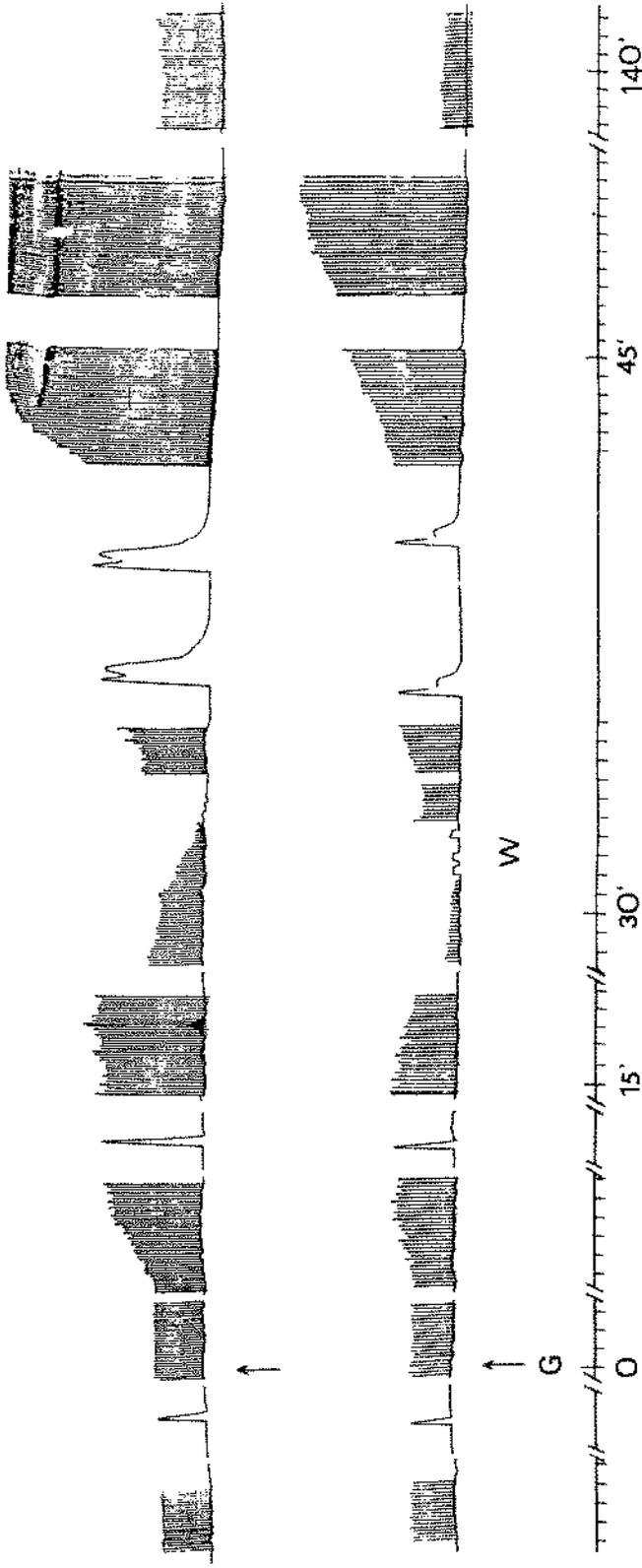


Figura 3 - Registro da força de contração muscular da preparação nervo frênico diafragma isolado de camundongo sob estímulo indireto (0,2 mseg, 0,1 Hz) em presença da guanidina 10 mM. O registro superior e inferior apresentam duas experiências usando duas preparações distintas sendo realizadas ao mesmo tempo. Em W, lavagem da preparação através de 3 substituições sucessivas da solução nutritiva. Notar a presença de pós-contração e de aumento do transcurso da resposta muscular. Na escala de tempo cada divisão corresponde a 1 minuto. A barra vertical representa a tensão de 2 g/cm.

I

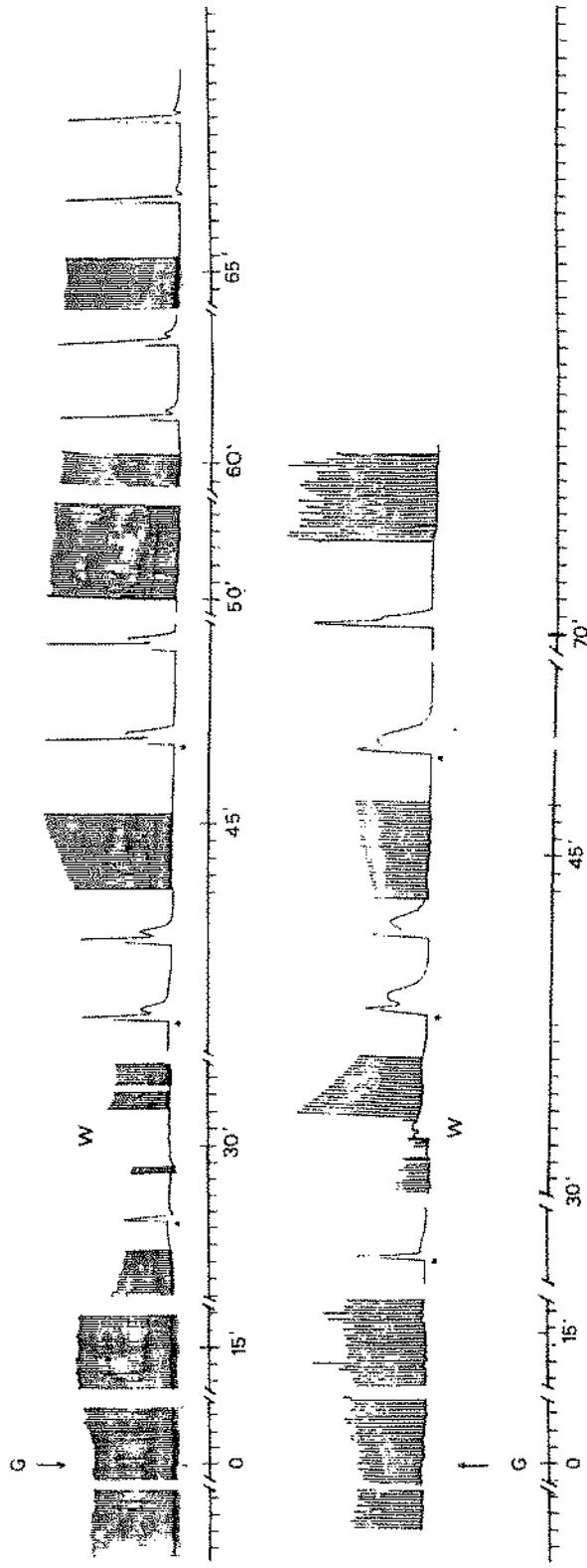


Figura 4 - Registro da força de contração muscular do diafragma isolado de camundongo sob estímulo direto (70 v, 0,1 Hz e 2 msec de duração). O registro superior e inferior representam também duas experiências distintas. Em G, guanidina, em W, lavagem da preparação. Na escala de tempo cada divisão corresponde a 1 minuto. A barra vertical representa a tensão de 2 g/cm.

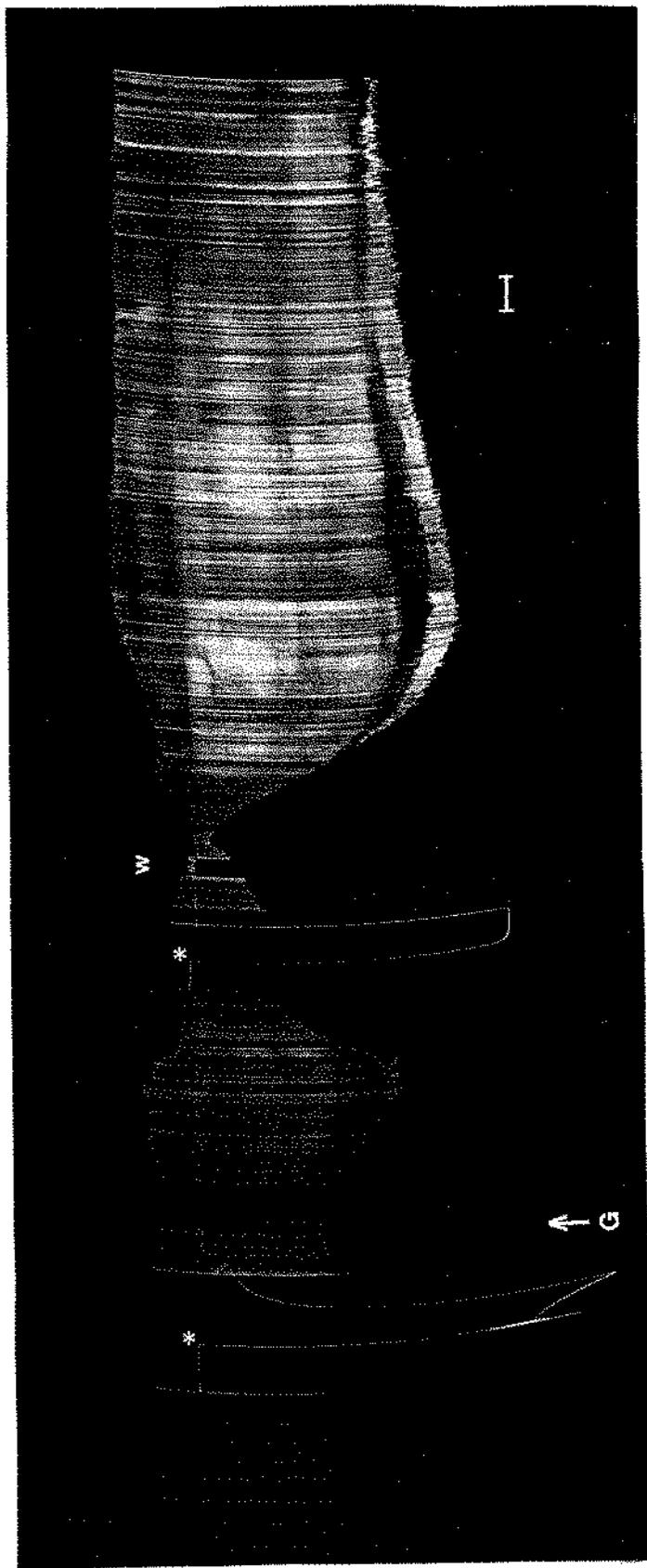


Figura 5 - Registro miográfico da preparação nervo frênico diafragma isolado de rato sob estímulo indireto (0,2 mseg, 0,1 Hz). Representação típica da ação trifásica da guanidina: facilitação primária, bloqueio e facilitação secundária. Em (*): o tétano pós-guanidina não promove a facilitação pós-tetânica como no estímulo tetanizante anterior. Em G, guanidina 10 mM. Em W, lavagem da preparação. A barra horizontal representa 6 minutos.

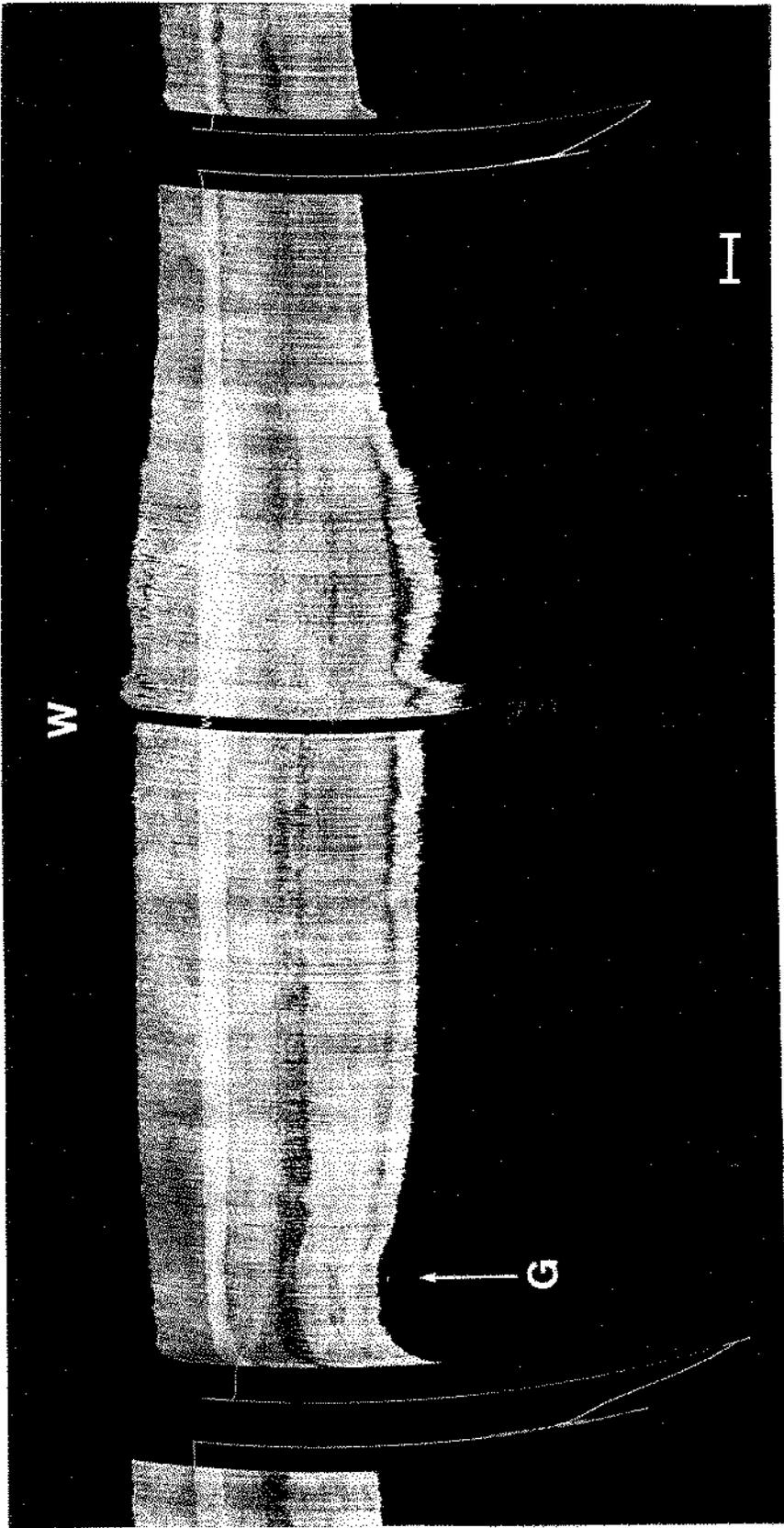


Figura 6 - Registro miográfico da preparação nervo frênico diafragma isolado de rato sob estímulo indireto (0,2 mseg, 0,1 Hz). Em G, guanidina 1 mM. Nesta dose a guanidina exibe somente seu efeito facilitador. Em W, lavagem da preparação. A barra horizontal representa 6 minutos.

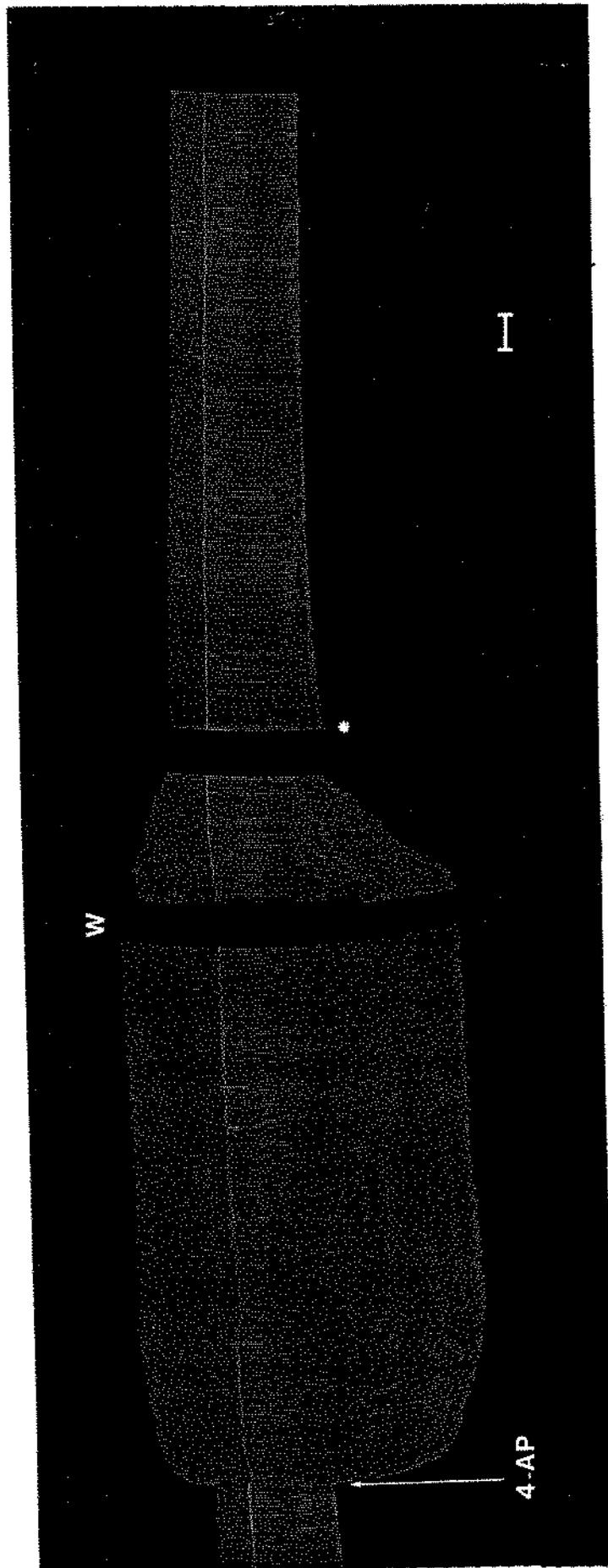


Figura 7 - Registro miográfico de preparação nervo frênico diafragma isolado de rato sob estímulo indireto (0,2 msec, 0,1 Hz). O efeito facilitatório se mantém após lavagem, voltando gradualmente para o nível de amplitude igual ao controle. Em 4-AP, 10 µg 4-aminopiridina. Em W, lavagem. Em *, 15 minutos depois.

A barra horizontal representa 4 minutos.

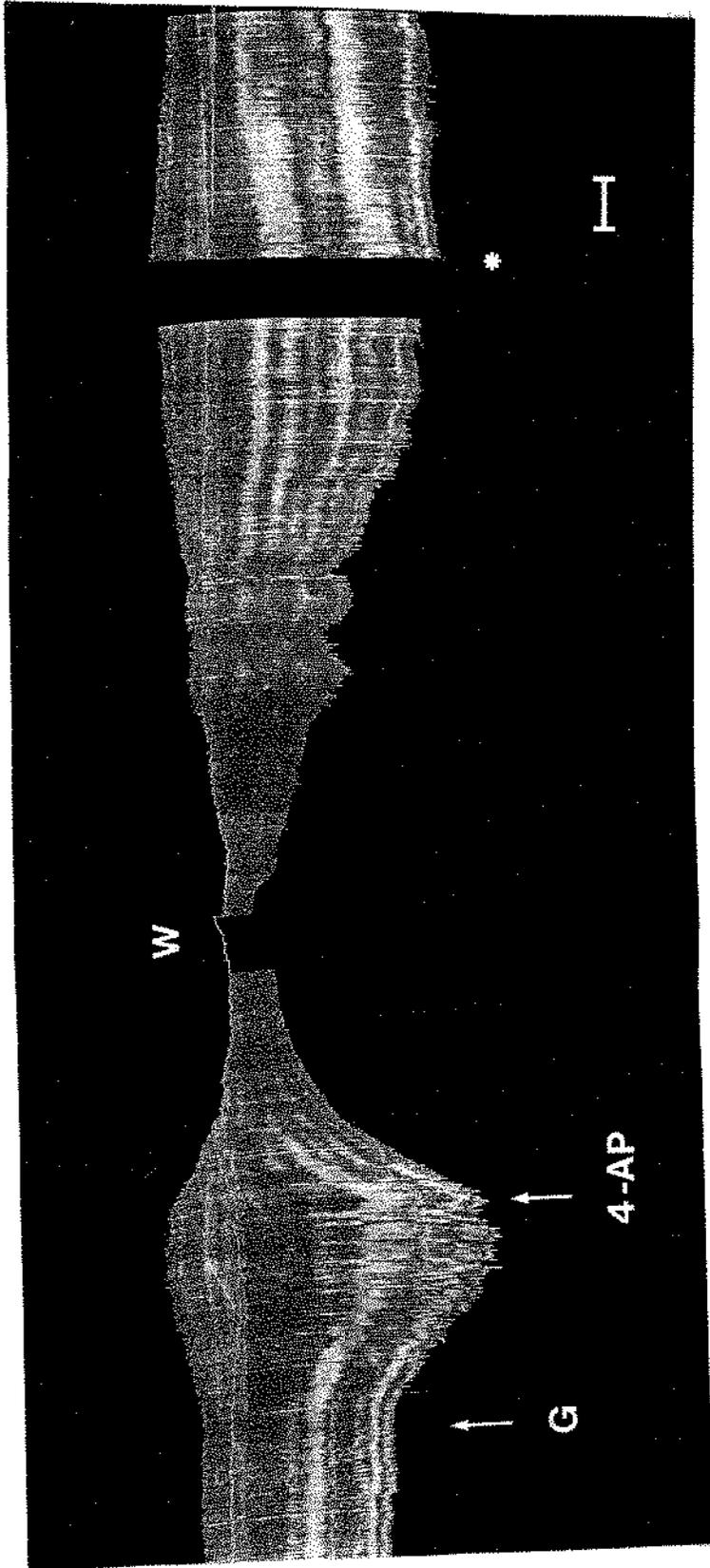


Figura 8 - Registro miográfico da preparação nervo frênico diafragma isolado de rato sob estímulo indireto (0,2 mseg, 0,1 Hz). Observar o efeito da guanidina e 4-aminopiridina 10 µg na junção neuromuscular de rato. Observar ainda que a adição de 4-AP após guanidina não alterou o comportamento desta última. (*) 20 minutos depois. W - lavagem. A barra horizontal representa 6 minutos.

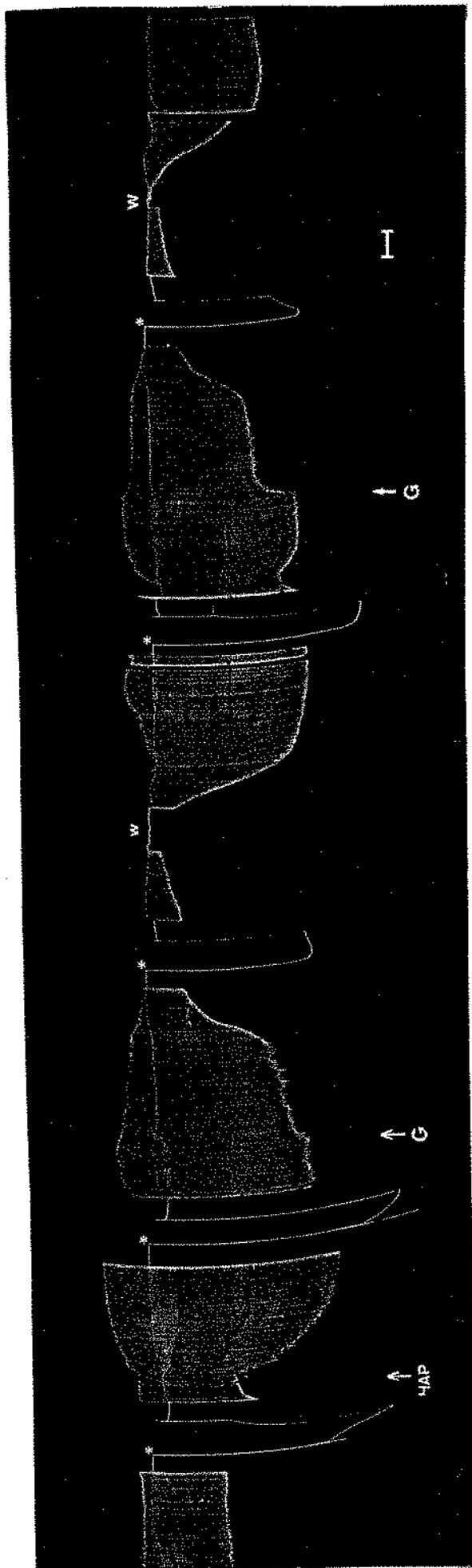


Figura 9 - Registro miográfico da preparação nervo frênico diafragma isolado de rato sob estímulo indireto (0,2 mseg, 0,1 Hz). Observar o efeito da guanidina (G 10 mM) e da 4-aminopiridina (4-AP 10 µg). Notar que a adição da guanidina ao banho após a 4-AP determina a ausência do efeito facilitatório inicial. Em * estímulo tetanizante. Em W, lavagem. A barra horizontal representa 6 minutos.

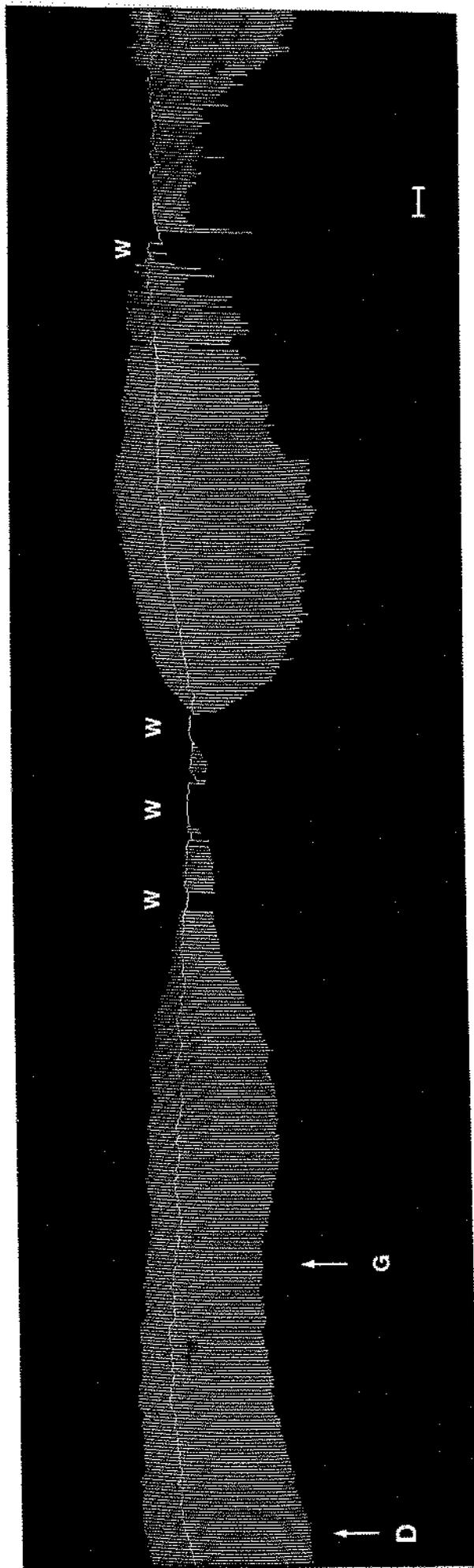


Figura 10 - Registro miográfico da preparação nervo frênico diafragma isolado de rato sob estímulo indireto (0,2 mseg, 0,1 Hz) em presença de guanidina (G-10 mM) e Dantrolene (D-5 µg). W - lavagem. A barra horizontal representa 4 minutos.

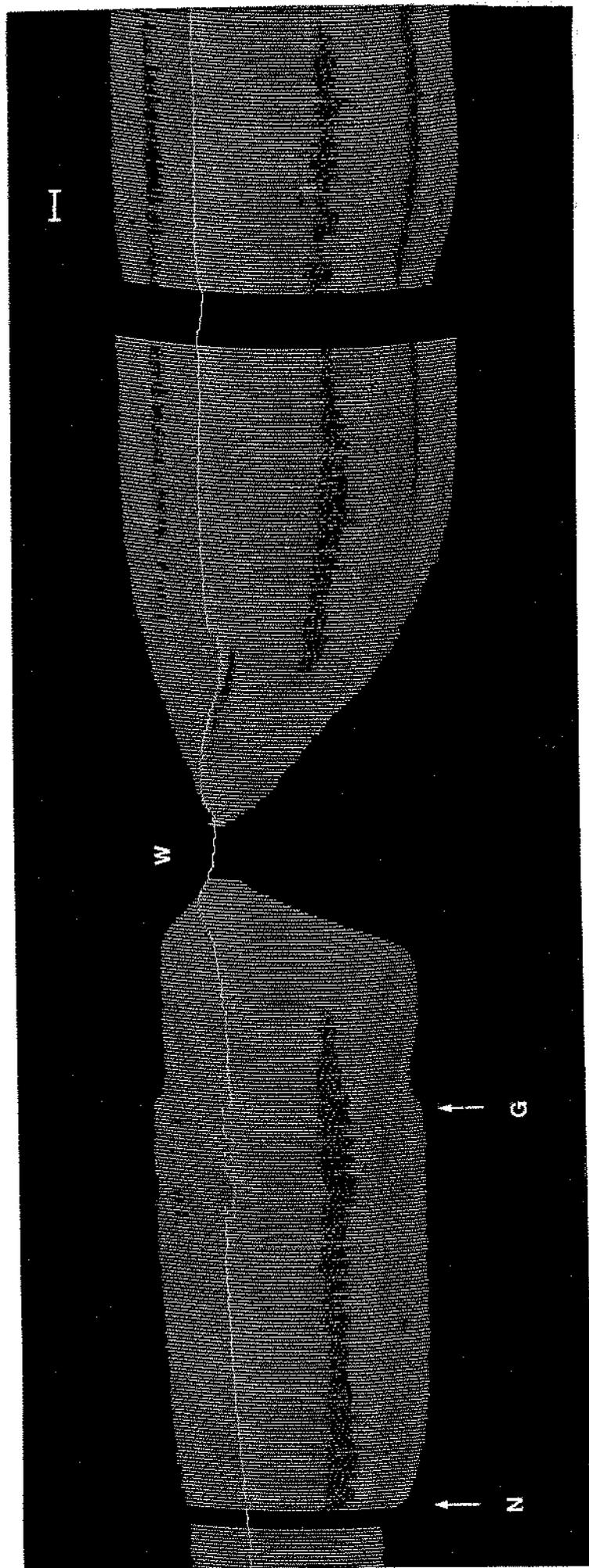


Figura 11 - Registro miográfico da preparação nervo frênico diafragma isolado de rato sob estímulo indireto (0,2 mseg, 0,1 Hz). Em presença de guanidina (G-10 mM) e nifedipina (N-2 μ M). Observar que o efeito facilitatório inicial foi suprimido pela nifedipina. Em W, lavagem. A barra horizontal representa 4 minutos.

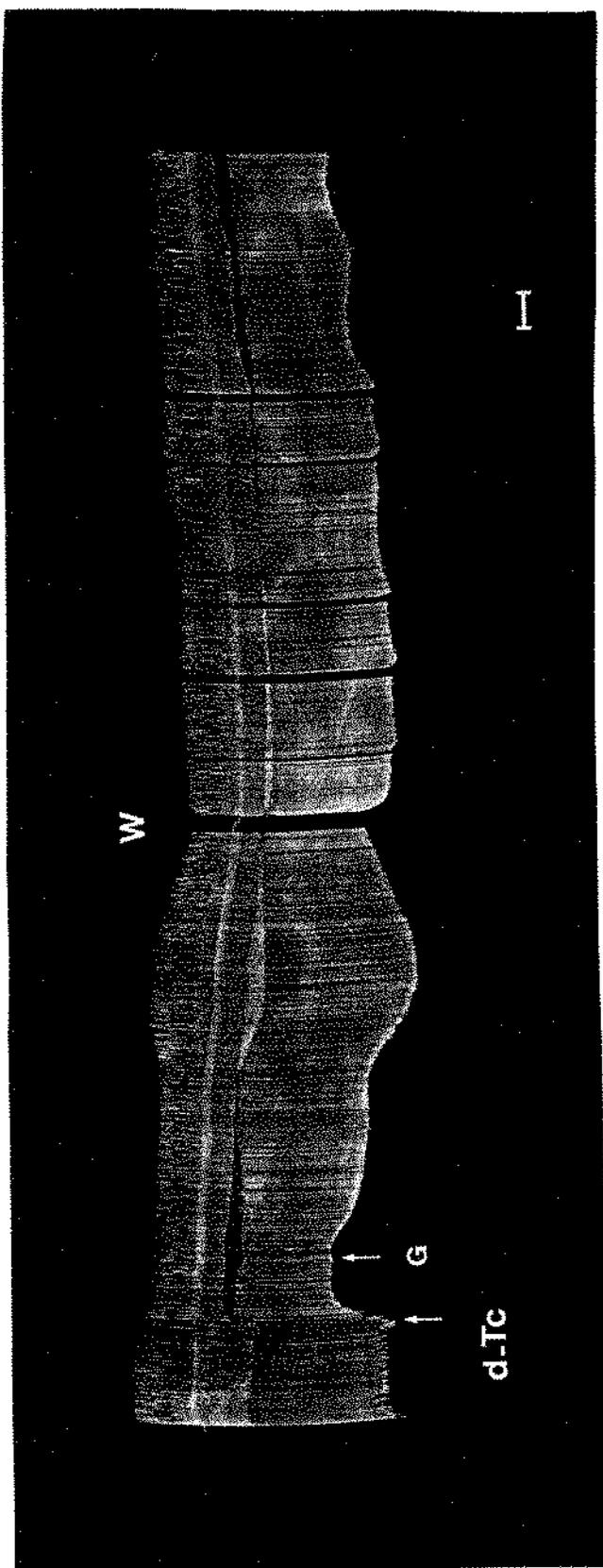


Fig. 12 - Registro miográfico da preparação nervo frênico diafragma isolado de rato sob estímulos máximos (0,1 Hz, 2 mseg) aplicados diretamente no músculo. Em dTc, d-tubocurarina 10 µg/ml. Em G, guanidina 10 mM. A guanidina reverte o bloqueio produzido pela dTc e não exibe bloqueio nem facilitação pós-lavagem. Em W, lavagem. A barra horizontal representa 6 minutos.

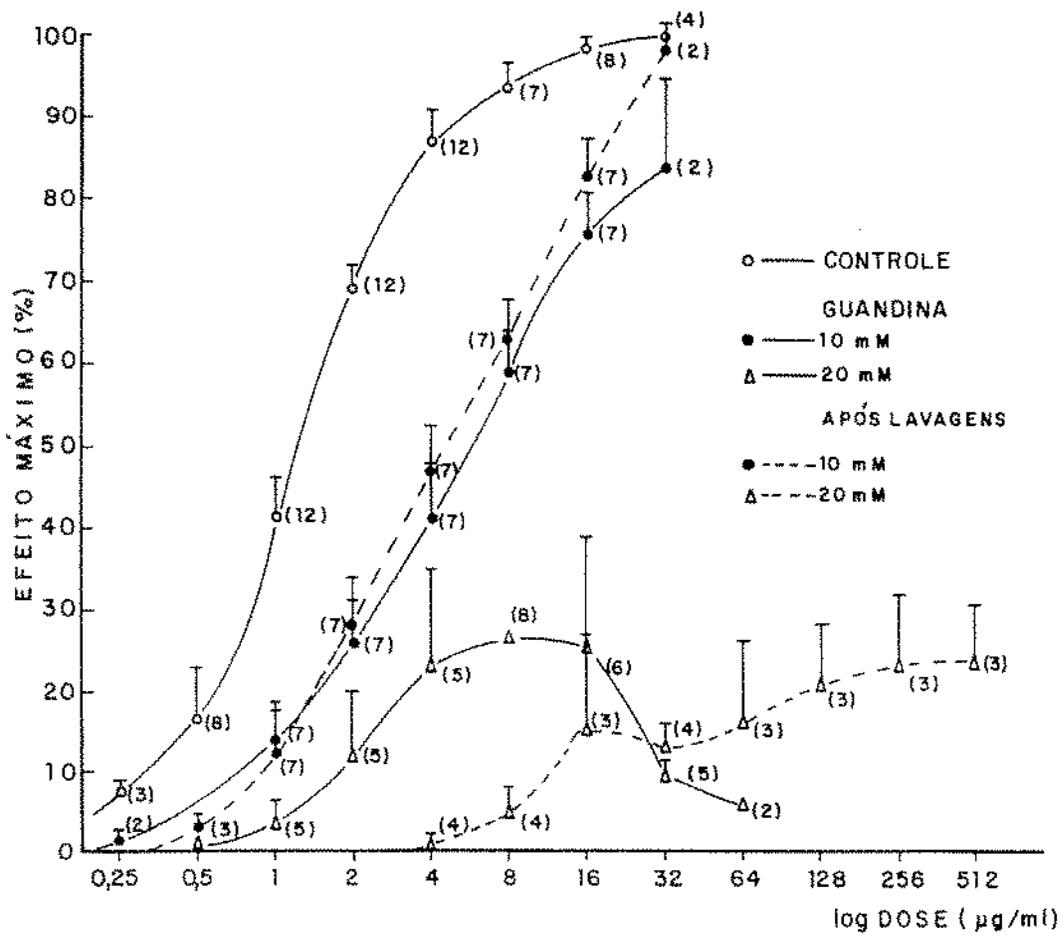


Figura 13 - Representação gráfica da curva dose-efeito da acetilcolina em diafragma cronicamente desnervado de rato. Observar o efeito da guanidina (10 mM, 20 mM), antes e após lavagem.

TABELA II

Efeito da guanidina (10 m), sobre o potencial de repouso de fibras musculares de diafragma isolado de camundongo antes e pós-lavagem.

GUANIDINA								
	15'	30'	60'	W	15'	30'	60'	
CONTROLE								
79.6	76.8	73.2	70.4		75.2	73.6	70.8	
75.6	78.8	74.8	68.0		79.6	80.0	72.4	
77.2	76.0	76.0	71.2		70.4	67.6	-	
78.4	77.2	70.8	68.8		69.2	67.6	67.2	
76.8	64.0	65.2	64.8		65.2	70.4	56.0	
80.0	78.4	-	-		-	-	-	
80.0	-	83.0	81.0		71.0	76.0	72.0	
80.0	79.2	79.2	72.8		81.6	80.0	79.2	
72.8	73.2	-	63.6		79.2	-	78.4	
84.8	62.8	73.2	58.8		62.8	72.0	80.8	
77.6	81.6	78.0	66.0		77.6	80.8	-	
70.8	82.4	70.8	64.8		64.8	76.4	-	
81.0	62.8	76.8	-		68.0	74.0	-	
72.2	66.8	51.2	58.0		73.6	76.0	56.8	
84.8	65.6	77.6	56.4		65.2	72.0	-	
76.4	72.2	74.4	53.2		-	-	-	
79.6	76.8	73.2	70.4		75.2	73.6	70.8	
75.6	78.8	74.8	68.0		79.6	80.0	72.4	
77.2	76.0	76.0	71.2		70.4	67.6	-	
78.4	77.2	70.8	68.8		69.2	67.6	67.2	
76.8	64.0	65.2	64.8		65.2	70.4	56.0	
80.0	78.4	-	-		-	-	-	
80.0	-	83.0	81.0		71.0	76.0	72.0	
80.0	79.2	79.2	72.8		81.6	80.0	79.2	
Média	77.82	72.9	72.7	67.8		72.18	74.09	70.6
± Erro Padrão	±0.78	±1.69	±1.71	±1.53		±1.24	±0.98	±2.06

Obs.: Notar a ausência do efeito da guanidina em alterar os valores de PR.

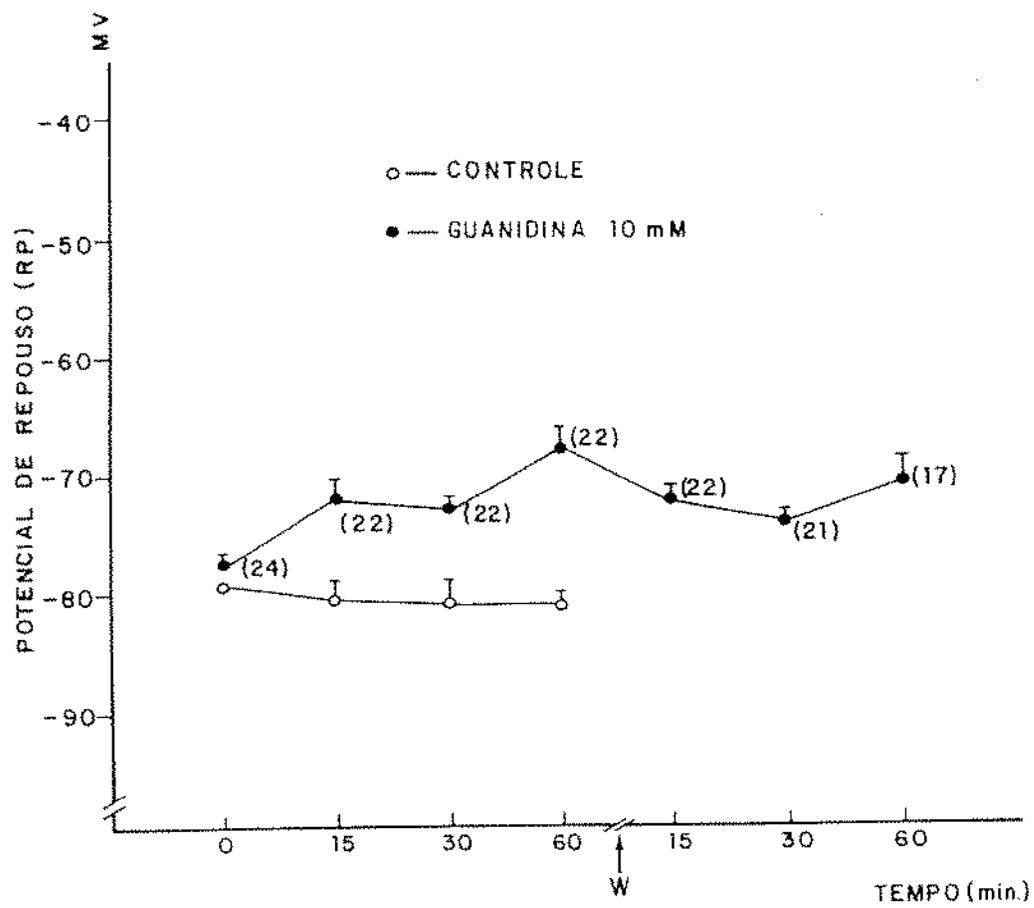


Figura 14 - Representação gr̃afica da ãção da guanidina (10 mM) sobre o potencial de repouso.

TABELA III

Efeito da guanidina (10 mM) sobre a despolarização induzida pelo carbacol (20 µg) em diafragma isolado de camundongo.

	CARBACOL		W		GUANIDINA		CARBACOL + GUANIDINA		W		TYRODE	
	15'	30'	30'	15'	30'	15'	30'	15'	30'	30'	15'	30'
CONTROLE												
	72.8	59.2	59.6	71.6	57.2	67.2	37.2	46				
	88.4	66	56	87.4	78.8	71.2	68.8	56			78.4	81.6
	85.6	69.6	64.8	86.0	88.8	84.4	68.8	68.4			86.4	86.4
	84.4	59.6	65.6	85.6	94.4	91.6	68.4	66			76.8	80.8
	80.8	84.4	62.00	90.8	85.6	84.8	67.2	62.8				
	88.8	81.2	84	-	-	-	-	-				
	84.8	72.4	66	86.4	90.4	91.6	77.2	66			80.4	80.8
	82.4	72.8	66.4	80.4	78.4	79.6	65.6	62.8			68.4	80.8
Média	83.45	70.65	64.3	84.02	81.9	81.48	64.74	61.14			78.08	82.08
± Erro Padrão	±1.79	±3.22	±1.88	±2.05	±4.68	±3.57	±4.79	±2.93			±2.91	±1.09

Obs.: Cada valor representa a média do potencial de repouso de cinco fibras. Notar a ação despolarizante do carbacol na presença de guanidina.

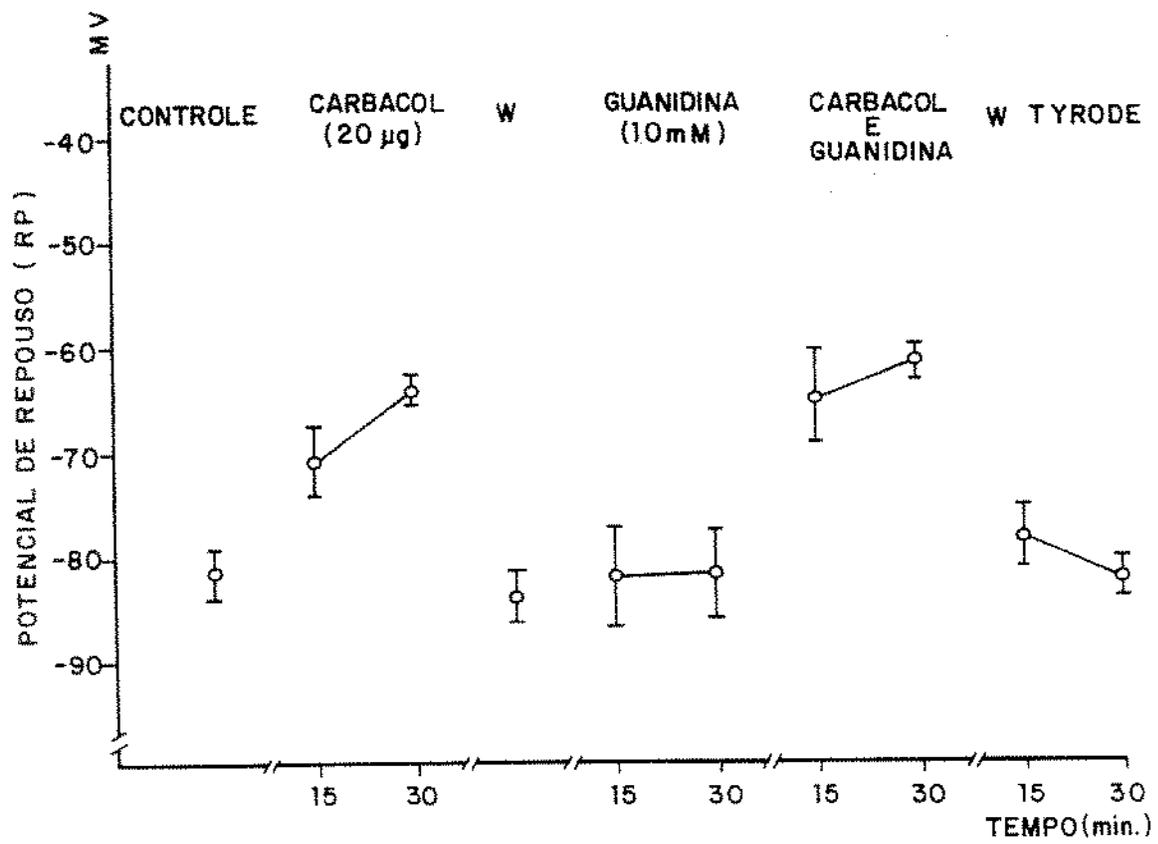


Figura 15 - Representação gráfica do efeito da guanidina (10 mM), sobre a despolarização induzida pelo carbacol (20 µg), em diafragma isolado de rato. Cada ponto representa a média de cinco experimentos. Em W, lavagem de preparação.

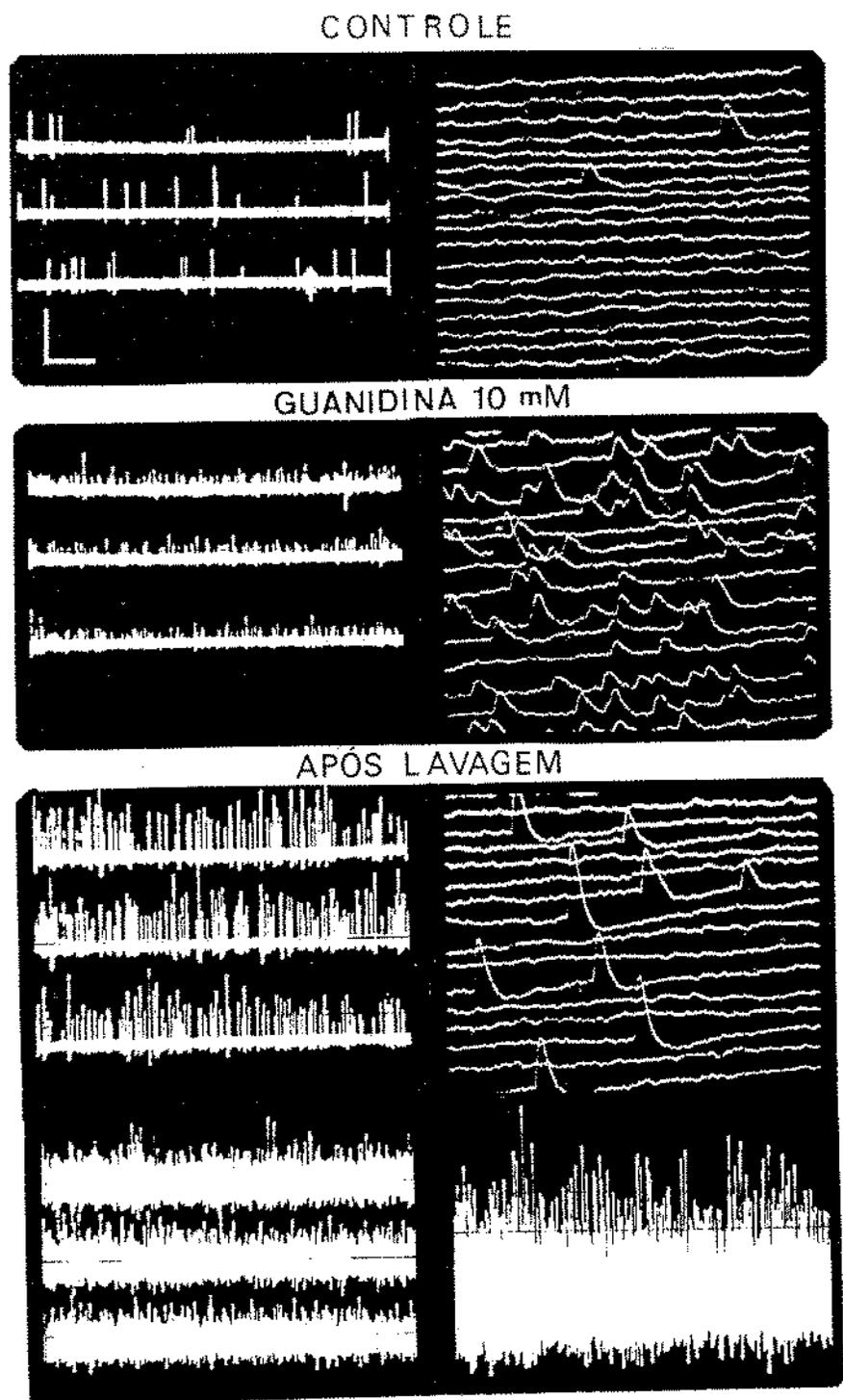


Figura 16 - Registro dos potenciais e placa terminal em miniatura, das fibras musculares de diafragma de camundongo. Barra vertical 1 mV, barra horizontal 10 mseg.

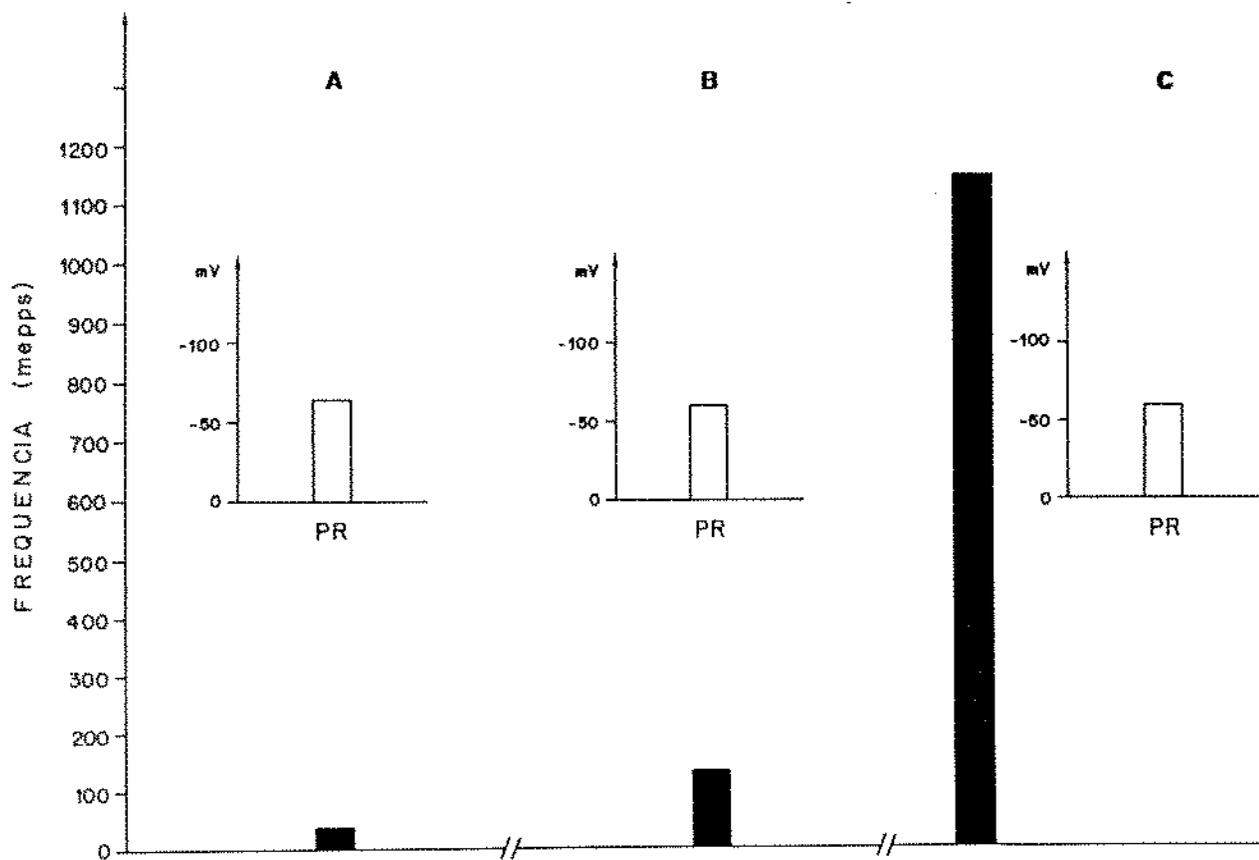


Figura 17 - Representação gráfica da freqüência dos potenciais em miniatura das placas terminais de diafragma de camundongo. Os histogramas representam a média de 6 experimentos. Em A controle, B após guanidina e C a retirada da guanidina após lavagem. Em PR valor do potencial de repouso.

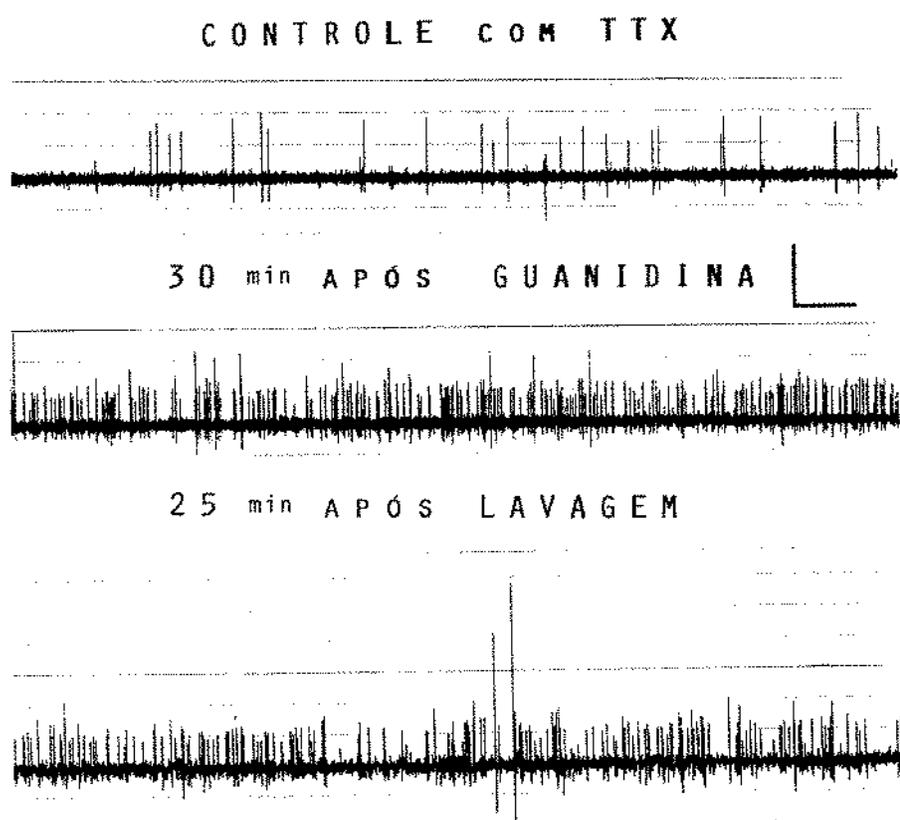


Figura 18 - Registro dos potenciais de placa terminal em miniatura, obtido com eletrodo intracelular, em preparações isoladas nervo diafragma de camundongo. Notar o aumento da frequência dos potenciais após guanidina. Barra vertical, 1 mV; barra horizontal 2,5 mm/seg.

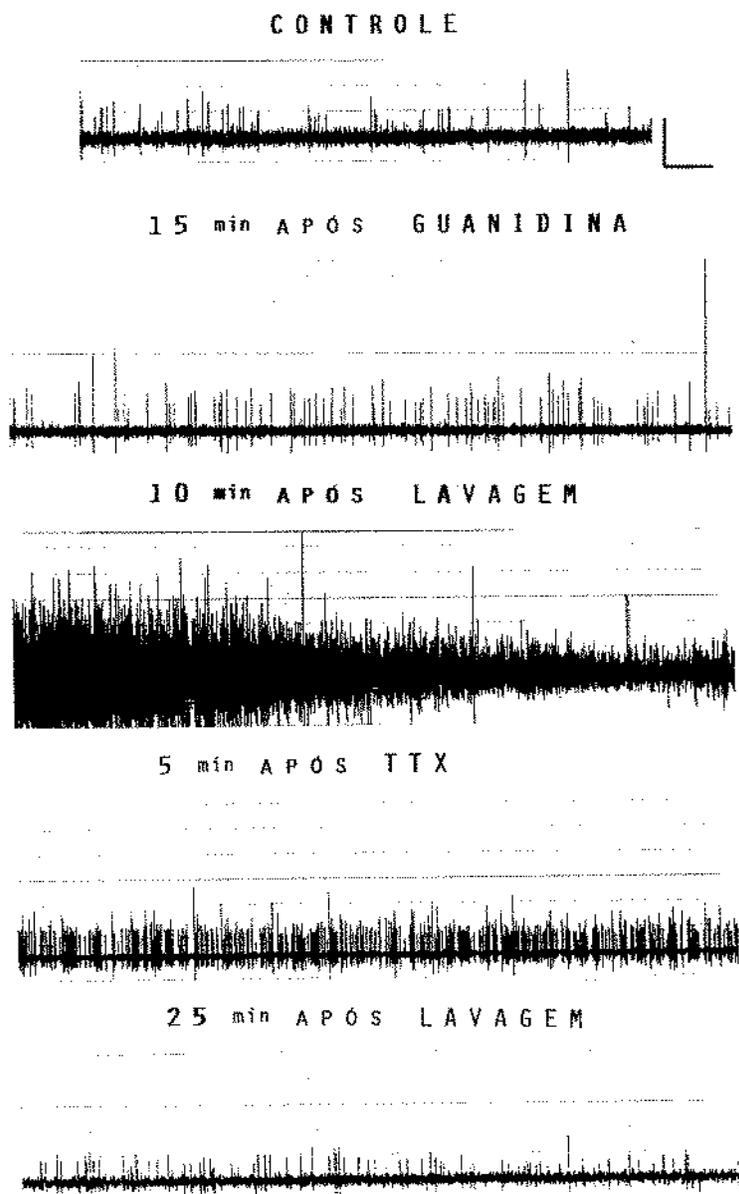
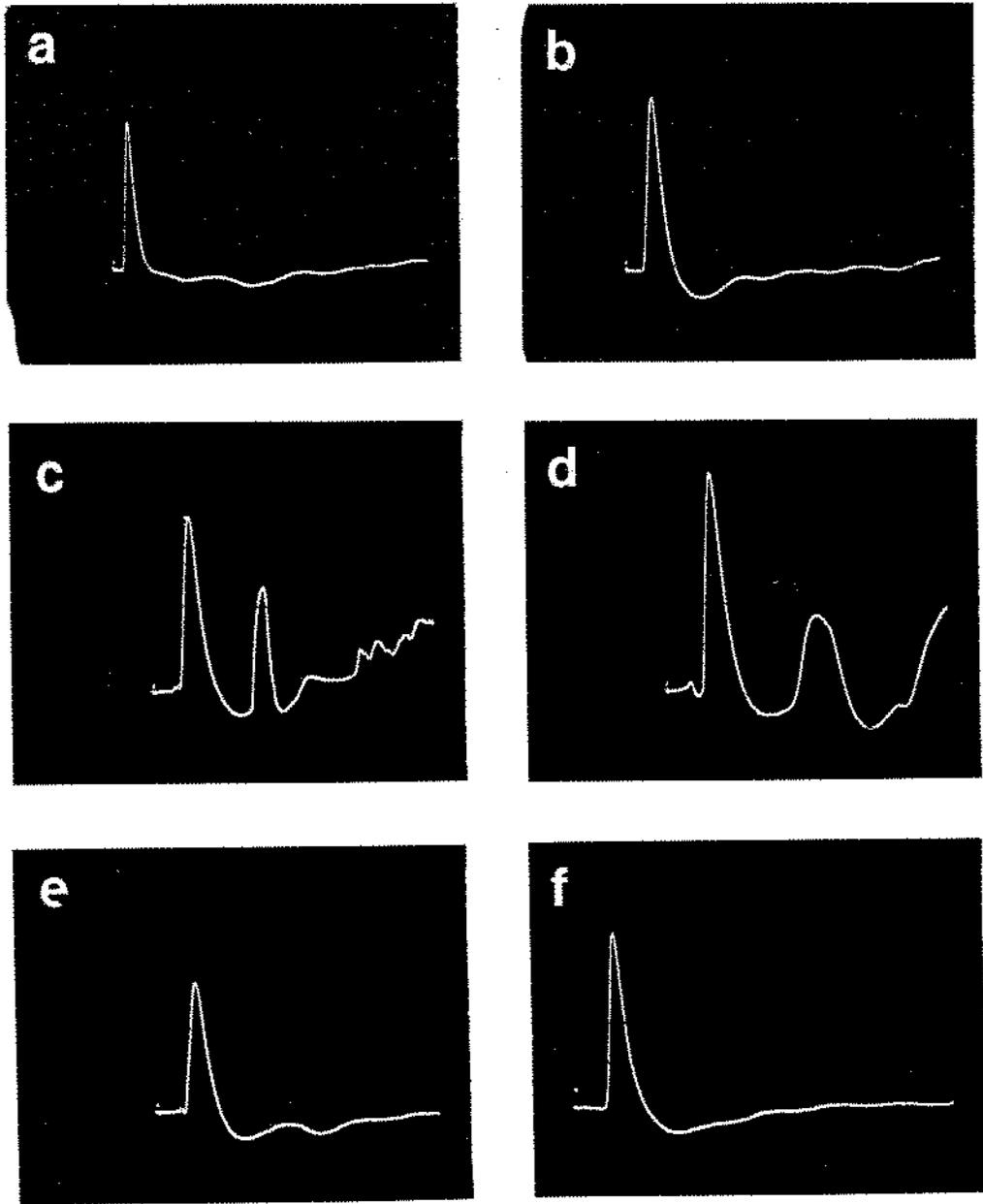


Figura 19 - Registro dos potenciais de placa terminal em miniatura em preparação nervo-diafragma isolado de camundongo. Barra vertical 1 mV; barra horizontal 2,5 mm/seg.



10 mV 
 10 msec 

Figura 20 - Registro do potencial de ação composto de músculo diafragma de rato antes e após a adição da guanidina (10 mM). Em A - controle, em B, C, D, E, F, respectivamente, 15, 30, 35, 45 e 125 minutos após a adição de guanidina. Notar o aumento da duração do potencial, assim como o aparecimento de potenciais repetitivos em resposta a um único estímulo. Estímulos máximos com 0,2 msec de duração e 0,1 Hz de frequência.

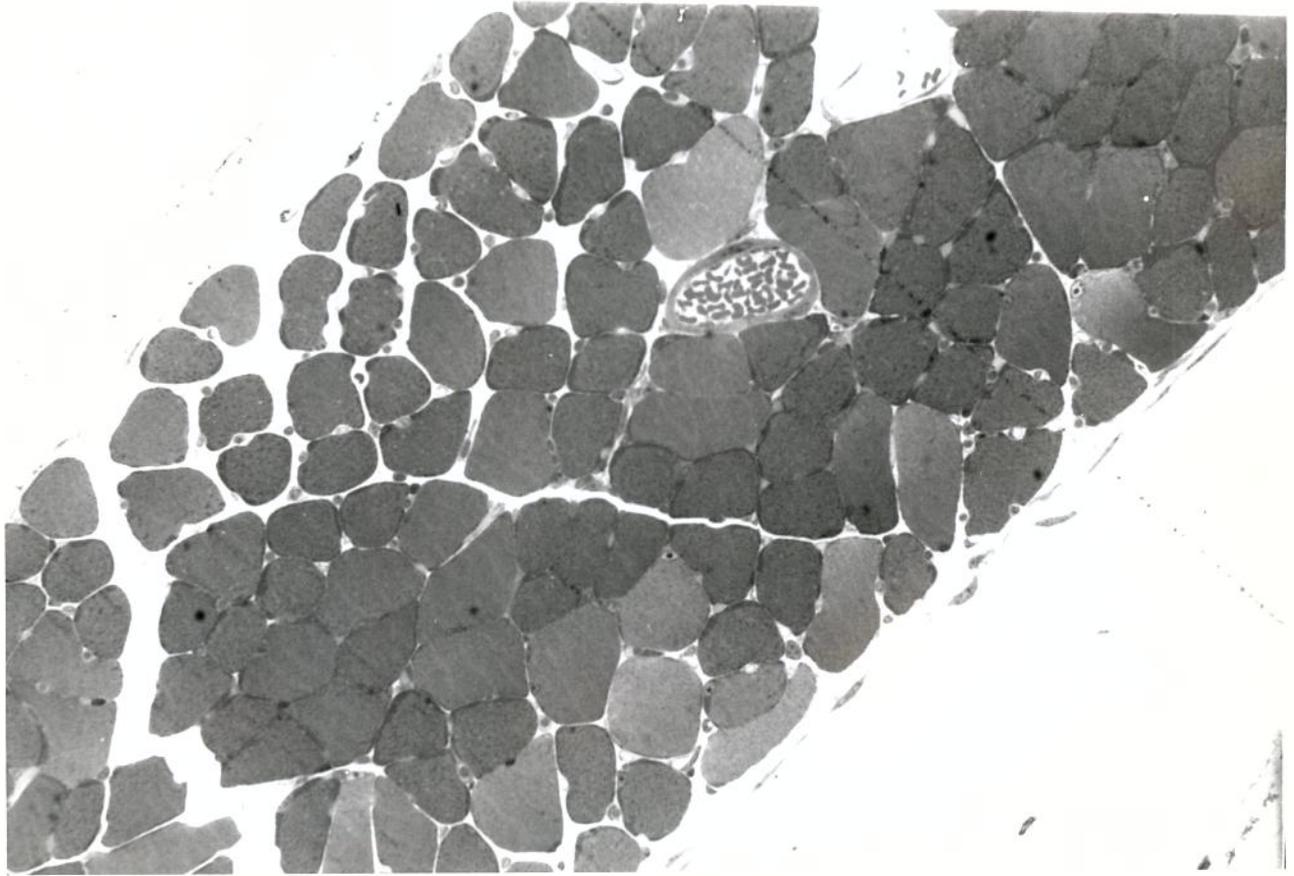


Fig. 21 - Diafragma de camundongo normal incubado com Tyrode sob estímulo elétrico. As fibras musculares mostram-se íntegras. Secções de 1 μ m de espessura, incluídas em Epon. Azul de Toluidina. X 1100.

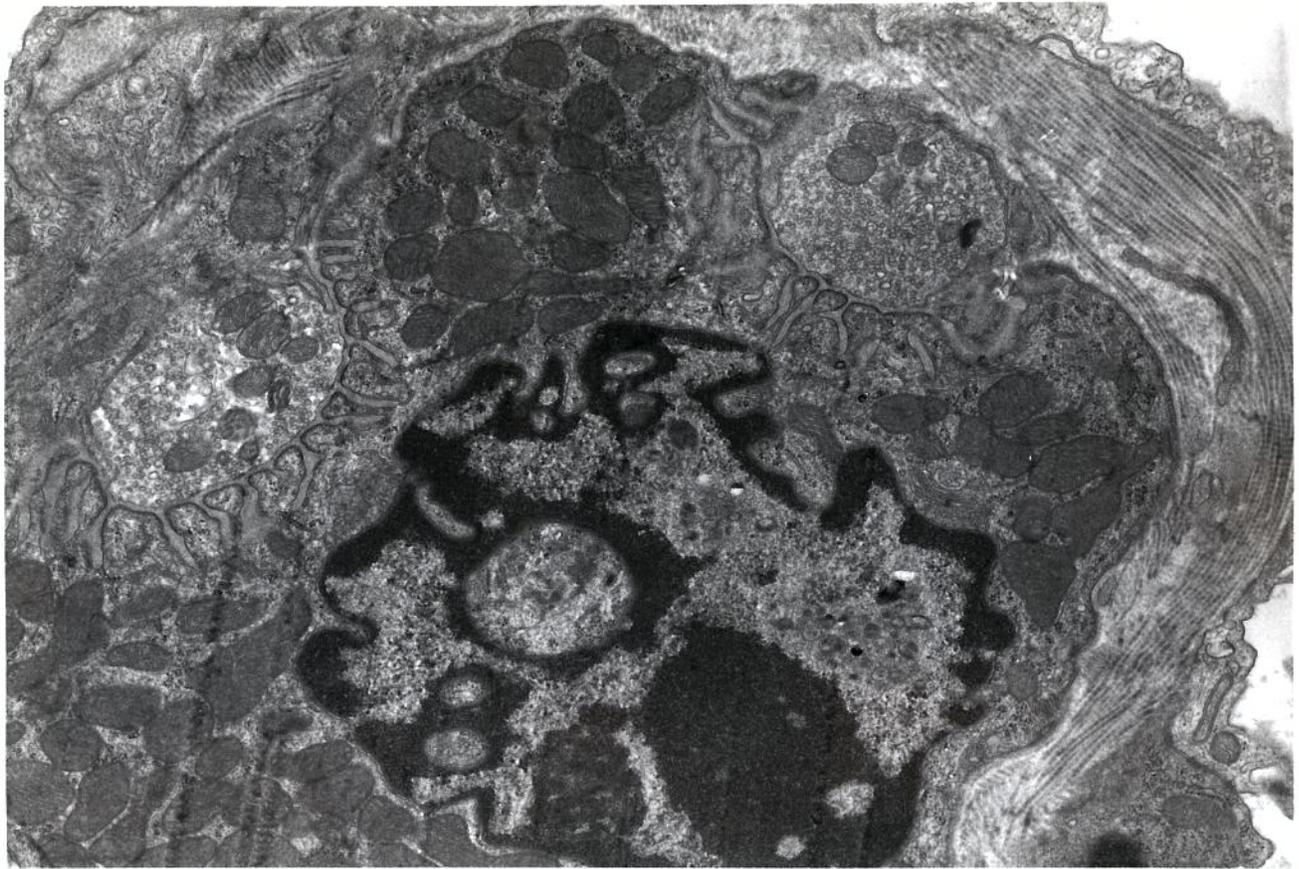


Fig. 22 - Diafragma de camundongo controle - 0 horas, mostrando a ultra-estrutura típica da junção neuromuscular, cujo terminal nervoso contém vesículas sinápticas e mitocôndrias, e a região sub-sináptica com as dobras juncionais, o sarcoplasma subjacente e o núcleo da placa X 15.120.



Fig. 23 - Diafragma de camundongo incubado com guanidina (10 mM) por 60 minutos sob estímulo elétrico: Mionecrose com diferentes graus de degeneração das fibras. A fragmentação da fibra pode levar à completa lise miofibrilar, restando apenas núcleo e sarcolema. Notar ainda, a tumefação e as alterações de forma, tamanho e densidade das fibras musculares. Um fascículo de frênico atravessa, com orientação longitudinal, por entre as células musculares. X 1100.

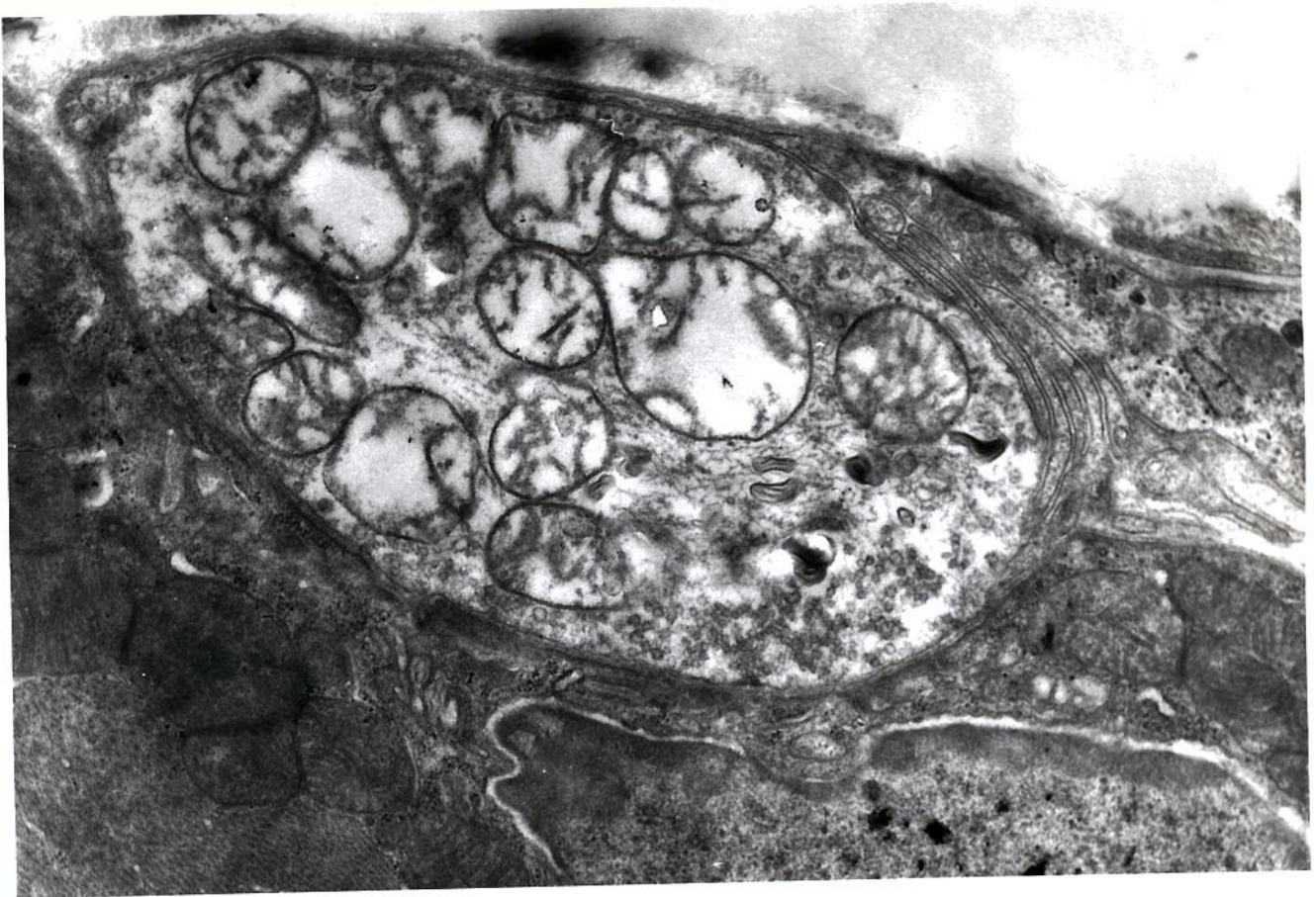


Fig. 24 - Incubação com guanidina por 60 minutos sob estimulação elétrica. As mitocôndrias são as estruturas mais afetadas, com tumefação e alteração na organização das cristas. X. 23.030.

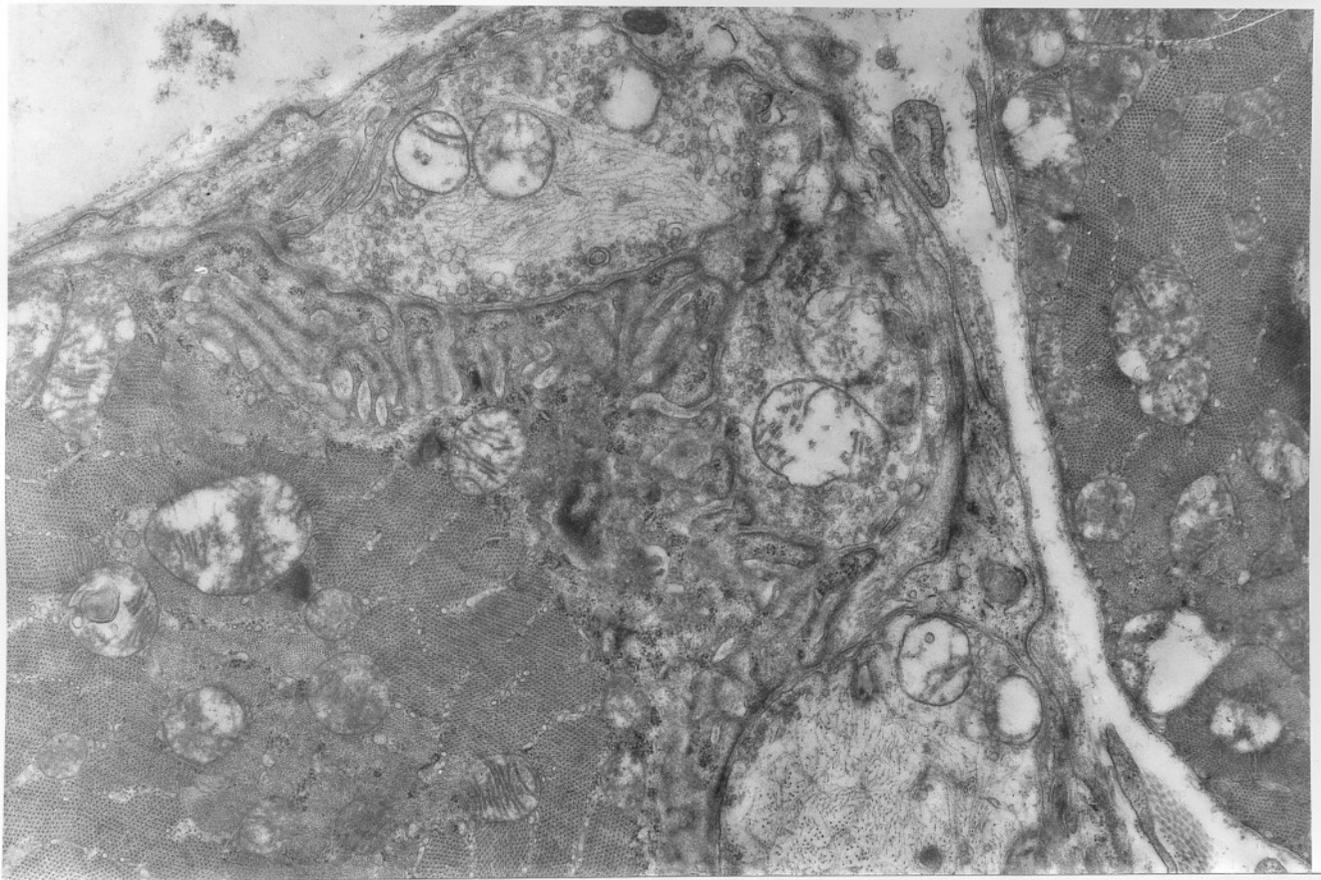


Fig. 25 - Preparação incubada com guanidina por 60 minutos sob estímulo elétrico. Notar a diminuição no número de vesículas sinápticas e a tumefação das mitocôndrias. Há quantidade incomum de microtúbulos e neurofilamentos axoplásmicos. As dobras junccionais estão atenuadas em alguns terminais. X 14.960.



Fig. 26 - Preparação nervo frênico diafragma de camundongo incubada com guanidina sob estímulo elétrico. Mionecrose acentuada de duas fibras. X 5.760.

VI - REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, A.J., HARVEY, A.L. Effects of the facilitatory compounds cathecol, guanidine, noradrenaline, and phencyclidine on presynaptic currents of mouse motor nerve terminals. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, New York, v. 338, 1988. p. 133-137.
- BANKS, F.W. The effect of guanidine on transmitter release in the ciliary ganglion of the chick. *Journal of Physiology*, London, v. 278, 1978. p. 425-433.
- BLAUSTEIN, M.P. The interrelationships between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Review of Physiology Biochemistry of Pharmacology*, West Germany, v. 70, 1974. p. 33-35.
- BRIGANT, J.L., MALLART, A. Presynaptic currents in mouse motor endings. *Journal of Physiology*, London, v. 333, 1982. p. 619-636.
- BROWN, J.C., JOHNS, R.J. Clinical and physiological studies of the effect of guanidine on patients with myasthenia gravis. *Johns Hopkins Medical Journal*, Baltimore, v. 124, 1963. p. 1-8.
- BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *British Journal of Pharmacology*, London, v. 1, 1946. p. 38-61.

- CAHALAN, M.D., BEGENISICH, T.B. Sodium channel selectivity; Dependence on internal permeant ion concentration. *The Journal of General Physiology*, New York, v. 68, 1976. p. 111-125.
- CAMPBELL, D.T. Ionic Selectivity of the Sodium channel of frog skeletal muscle. *The Journal of General Physiology*, New York, v. 67, 1976. p. 295-307.
- CARAFOLI, E., TIOZZO, R., LIGLI, G., et al. The release of calcium heart mitochondria by sodium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, New York, v. 6, 1974. p. 361-371.
- CHANCE, B., HOLLUNGER, G. Inhibition of electron and energy transfer in mitochondria - II. The site and mechanism of guanidine action. *The Journal of Biological Chemistry*, Rockville Pike, Bethesda, v. 238, n. 1, jan., 1963. p. 432-437.
- CHERINGTON, M., RYAN, D.W. Botulism and guanidine. *New England Journal of Medicine*, Boston, v. 278, 1968. p. 931-935.
- COSTA, A.F. Fármacos com alcalóides. In: _____. *Farmacognosia*. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1978. 2v. v. 2, cap. 4, p. 371-447.
- CRUZ-HÖFLING, M.A., RODRIGUES-SIMIONI, L., VITAL BRASIL, O. Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the Coral snake *Micrurus corallinus*. *Memórias do Instituto Butantan*, São Paulo, v. 47/48, 1983/84. p. 95-105.

- CRUZ-HÖFLING, M.A., DUCHEN, L.W., LOVE, S. Alteration in the morphology of myelinated nerve fibres caused by *Phoneutria Leiurus* or *Centruroides* venom are prevented by tetrodotoxin. *Journal of Physiology*, London, v. 365, 1985. p. 27.
- CRUZ-HÖFLING, M.A., LOVE, S., BROOK, G. et al. Effects of *Phoneutria nigriventer* spider venom on mouse peripheral nerve. *quarterly Journal of Experimental Fisiology*, London, v. 70, 1985. p. 623-640.
- CRUZ-HÖFLING, M.A., RODRIGUES-SIMIONI, L., NEDER, F. et al. Effect of veratrine on the ultrastructure of nerve terminals of the mouse diaphragm *in vitro*. [s.l.: s.n.] 1987. Trabalho apresentado no colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 11, Caxambú, 1987.
- D'ARRIGO, J.S. Possible screening of surface charges on crayfish axons by polyvalent metal ions. *Journal of Physiology*, London, v. 231, 1973. p. 117-128.
- DAVIDOFF, F. Effects of guanidine derivatives on mitochondrial function. *The Journal of Biological Chemistry*, Rockville Pike Betherda, v. 249, n. 20, Oct., 1974. p. 6406-6415.
- DESMEDT, J.E. Guanidine et myasthénie grave. *Revue Neurologique*, Paris, v. 94, n. 2, 1956. p. 154-158.
- DREYER, F., PENNER, R. The actions of presynaptic snake toxins on membrane currents of mouse motor nerve terminals. *Journal of Physiology*, London, v. 386, 1987. p. 455-463.

- DUNCAN, L.J.P., CLARKE, B.F. Pharmacology and the mode of action of the hypoglycemic sulphonylureas and diguanides. *Annual Review of Pharmacology*, Palo Alto, CA, v. 5, 1965. p. 151.
- ELMQVIST, D., LAMBERT, E.H. Detailed analysis of neuromuscular transmission in a patient with the myasthenic syndrome sometimes associated with bronchogenic carcinoma. *Mayo Clinic Proceedings*, Rochester, Minn, v. 43, Oct., 1968. p. 689-713.
- FAMBROUCH, D.M, DRACHMAN, D.B., SATYAMURTY, S. Neuromuscular junction in myasthenia gravis: decreased acetylcholine receptors. *Science*, Washington, v. 182, Oct., 1973. p. 293-295.
- FARLEY, J.M., GLAVINOVIC, M.I., WATANABE, S. et al. Stimulation of transmitter release by guanidine derivatives. *Neuroscience*, Oxford, England, v. 4, 1979, p. 1511-1519.
- FENG, T.P. Studies on the neuromuscular junction. X. The effects of guanidine. *Chinese Journal of Physiology*, Taipei, Taiwan, v. 15, 1938. p. 119-140.
- FENG, T.P. Studies on the neuromuscular junction: local potentials around neuromuscular junctions evoked by single and multiple volleys. *Chinese Journal of Physiology*, Taipei, Taiwan, v. 15, 1940. p. 367-404.
- FONTANA, M.D., SOUZA, I.G., NOTO, A.R. Aumento de amplitude das contrações da preparação nervo frênico-diafragma de rato causada pela quinidina. [s.l.: s.n.], 1990. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro e Neurociências, São Paulo, 1990.

- FONTANA, M.D., VITAL BRAZIL, O. Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic-nerve diaphragm of the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 18, Oct., 1985. p. 557-565.
- GERGENS, E., BAUMANN, E. Eeber das verhalten des guanidin, dyeyandiamidin, und ajanainid in organismus. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, New York, v. 12, 1876. p. 205-214.
- HILLE, B. The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium. *Journal of General Physiology*, Provincentown, MA, v. 50, 1967. p. 1287-1302.
- _____. The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. *Journal of General Physiology*, Provincentown, MA, v. 58, 1971. p. 599-619.
- HILLE, B., WOODHULL, A.M., SHAPIRO, B.I. Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions and pH. *Philosophical Transation of Royal Society of London*, London, v. 270, 1975. p. 301-318.
- HOFMANN, W.W., PARSONS, R.L., FEIGEN, G.A. Effects of temperature and drugs on mammalian motor nerve terminals. *American Journal of Physiology. Rockville Pike Bethesda*, v. 211, 1966. p. 135-140.
- ITO, Y., MILEDI, R., VICENT, A. et al. Acetylcholine receptors and end-plate electrophysiology in myasthenia gravis. *Brain*,

London, v. 101, 1978. p. 345-368.

KAMENSKAYA, M.A., ELMQVIST, D., THESLEFF, S. Guanidine and neuromuscular transmission a. effect on transmitter release occurring spontaneously and in response to single nerve stimuli. *Archives of Neurology*, Chicago, v. 32, Aug., 1974. p. 505-509.

KAMENSKAYA, M.A., ELMQVIST, D., THESLEFF, S. Guanidine and neuromuscular transmission b. effect on transmitter release in response to repetitive nerve stimulation. *Archives of Neurology*, Chicago, v. 32, Aug., 1974. p. 510-518.

KANNETERUD, G.L., MEINERT, C.L., KLIMT, C.R. et al. Effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes. IV. A preliminary report on Ph enformin results. *The Journal of the American Medical Association*, JAMA, Chicago, v. 217, n. 6, Aug., 1971, p. 777-784.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, New York, v. 27, 1965. p. 137A-138A.

KATZ, B., MILLEDI, R. Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. *Journal of Physiology*, London, v. 203, Apr., 1969. p. 689-706.

KEYNES, R.D. Ion channels in the nerve-cell membrane. *Scientific American*, New York, v. 240, n. 3, 1979. p. 98-107.

KONISHI, T. Electrical excitability of motor nerve terminals in

- the mouse. *Journal of Physiology*, London, v. 366, 1985. p. 411-421.
- KUSANO, K. Effect of guanidine on the squid giant synapse. *Journal of Neurobiology*, New York, v. 1, 1970. p. 459-469.
- LAMBERT, E.H. Defects of neuromuscular transmission in syndromes other than myasthenia gravis. *Annals of the New York Academy of Science*, New York, v. 135, 1966. p. 365-384.
- LARRAMENDI, L.M.H., LORENTE DE NÓ, R., VIDAL, F. Restoration of sodium-deficient frog nerve fibres by an isotonic solution of guanidinium chloride. *Nature*, London, v. 178, Aug II, 1956. p. 316-317.
- LORENTE DE NÓ, R., VIDAL, F. LARRAMENDI, L.M.H. Restoration of sodium-deficient frog nerve fibres by onium ions. *Nature*, London, v. 179, n. 4562, Apr. 6, 1957. p. 737-738.
- LOVE, S., CRUZ-HÖFLING, M.A. Acute swelling of nodes of Ranvier caused by venoms which slow inactivation of sodium channels. *Acta Neuropathologica*, Berlin, v. 70, 1986. p. 1-9.
- LOVE, S., CRUZ-HÖFLING, M.A., DUCHEN, L.W. Morphological abnormalities in myelinated nerve fibres caused by *Leiurus centrurioides* and *phoneutria* venoms and their prevention by tetrodotoxin. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, London, v. 71. 1986. p. 115-122.
- LUNDH, H., LEANDER, S., THESLEFF, S. Antagonism of the paralysis

produced by botulinum toxin in the rat. The effects of tetraethylammonium, guanidine and 4-aminopyridine. *Journal of the Neurological Sciences*, Amsterdam, v. 32. 1977. p. 29-43.

LUNDH, H., THESLEFF, S. The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals. *European Journal of Pharmacology*, Amsterdam, v. 42. 1977. p. 411-412.

MAROIS, R.L., EDWARDS, C. Repetitive end-plate potentials induced by guanidine and reduced calcium. *Federation Proceedings*, Bethesda, MD, v. 28, 1969. p. 669.

MATTHEWS, G., WICKELGREN, W.O. Effects of guanidine on transmitter release and neuronal excitability. *Journal of Physiology*, London, v. 266, 1977. p. 69-89.

MALLART, A. Electric current flow inside perineurial sheaths of mouse motor nerves. *Journal of Physiology*, London, v. 368, 1985. p. 565-575.

_____. A calcium - activated potassium current in motor nerve terminals of the mouse. *Journal of Physiology*, London, v. 368, 1985. p. 577-591.

_____. Some properties of calcium current in mouse motor endings. In: Rahamimoff. R., Katz B, ed. Calcium, neuronal function and transmitter release. Nijhoff Dodrecht, 1986. p. 35.

MINOT, A.S., DODD, K., RIVEN, S.S. Use of guanidine hydrochloride

- in treatment of myasthenia. gravis. *The Journal of the American Medical Association*, JAMA, Chicago, v. 113, n. 7. 1939. p. 553-559.
- MOLGÓ, J., MALLART, A. The mode of action of guanidine on mouse motor nerve terminals. *Neuroscience Letters*; Limerick, Ireland, v. 89, 1988. p. 161-164.
- NARAHASHI, T. Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiological Reviews*, Rockeville Pike, Bethesda, v. 54, n. 4, Oct., 1974. p. 813-869.
- OTSUKA, M., ENDO, M. The effect of guanidine on neuromuscular transmission. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Baltimor, v. 128, 1960, p. 273-282.
- PELHATE, M., PICHON, Y. Selective inhibition of potassium current in the grant axon of the cockroach. *Journal of Physiology*, London, v. 242. 1974. p. 90-91.
- PENNER, R., DREYER, F. Two different presynaptic calcium currents in mouse motor nerve terminals. *Pflugers Archiv. European Journal of Physiology*, New York, v. 406, 1986. p. 190-197.
- PRESSMAN, B.C; PARK, J.K. Competition between magnesium and guanidine for mitochondrial binding sites. *Biochemical and Biophysical Research communications*, New York, v. 11, n. 3, 1963. p. 182-186.
- PUBLICOVER, S.J., DUNCAN, C.J., SMITH, J.L. The use of A 23187

to demonstrate the role of intracellular calcium in causing ultrastructural damage in mammalian muscle. *Journal of Neuro-pathology and Experimental Neurology*, New York, v. 37, 1978. p. 544-557.

RAHAMIMOFF, R., ALNAES, E. Inhibitory action of Ruthenium Red on neuromuscular transmission. *Proceeding of the National Academy of Science*, Washington, v. 70, n. 12. Part I. 1973. p. 3613-3616.

RASH, J.E., ALBUQUERQUE, E.Y., HUDSON, C.S. et al. Studies of human myasthenia gravis; eletrophysiological and ultrastructural evidence compatible with antibody attachment to the acetylcholine receptor complex. *Proceeding of the National Academy of Science*, Washington, v. 73, n. 4, 1976. p. 584.

RODRIGUES-SIMIONI, L., PRADO-FRANCESCHI, J. Efeito da guanidina sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo. (s. n.t.). (Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 3, São Paulo, 1985).

SIMPSON, J.A. Myasthenia gravis: a new hypothesis. *Scottish Medical Journal*, St. Edinburgh, Scotland, v. 5, 1960. p. 419.

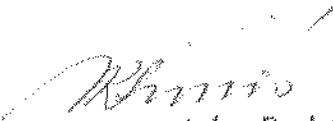
SMITH, G.B.L., SABETTA, V.J., STEINBACH JR., O.F. Quantitative study of the preparations of Guanidine nitrate and nitroguanidine. *Industrial and Engineering Chemistry*, Washington, v. 23, n. 10, p. 1124-1129, oct. 1931.

- TABTI, N., BOURRET, C., MALLART, A. Three potassium currents in mouse motor nerve terminals. *Pflugers Archiv, European Journal of Physiology*, New York, v. 413, 1989. p. 395-400.
- TASAKI, I., SINGER, I., WATANABE, A. Excitation of internally perfused squid giant axons in sodium-free media. *Proceeding of the National Academy of Science*, Washington, v. 54. 1965. p. 763-769.
- _____. Excitation of squid giant axons in sodium-free external media. *Journal of Physiology*, London, v. 211, 1966. p. 746-754.
- TERÄVÄINEN, H., LARSEN, A. Effect of guanidine on quantal release of acetylcholine in the mammalian myoneural junction. *Experimental Neurology*, New York, v. 48. 1975. p. 601-609.
- UNGAR, G., FREEDMAN, L., SHAPIRO, S.L. Pharmacological studies of a new oral hypoglycemic drug. *Proceeding of the Society for Biology and Medicine*, Baltimore, v. 95, 1957, p. 190-192.
- VITAL BRAZIL, O. Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. *O Hospital*, São Paulo, v. 68, n. 4, out., 1965. p. 909-929.
- VOLLE, R.L., BRANISTEANU, D.D. Statistical parameters of transmitter release at frog neuromuscular junctions treated with guanidine or tetraethylammonium. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Baltimore, v. 197, n. 3, 1976. p. 653-661.

- WATANABE, C.K. Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases. *Journal of Biological Chemistry*, Rockville Pike, Bethesda, v. 33, 1918. p. 253-265.
- WATT, George W., MAKOSKY, Robert C. Interaction of thiourea or ammonium thiocyanate and ammonia interaction of nitrourea and gaseous or liquid ammonia. *Industrial and Engineering Chemistry*, Washington, v. 46, n. 12, p. 2599-2602, Dec., 1954.
- WAYNE MOORE, G.R., BOEGMAN, R.J., ROBERTSON, D.M. et al. Acute stages of batrachotoxin-induced neuropath: a morphologic study of a sodium-channel toxin. *Journal of Neurocytology*, London, v. 15, 1986. p. 573-583.
- WEIL, C.S. Tables for convenient calculation of median effective dose (DL50 or ED50) and instructions in their use. *Biometrics*, Washington, v. 9, Sept., 1952. p. 249-263.
- WILLIAMS, R.H. ed. Oral drugs in diabets. In: _____. *Diabetes*. New York: B. Hoeber, 1960.
- WROGEMANN, K., PENA, S.D.J. Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet*, Boston, v. 27, mar. 1976. p. 672-674.

Este exemplar foi devidamente corrigido conforme
resolução da CCFG/036/83

Piracicaba, 25 de junho de 1991.


Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni
Orientadora