

CONSIDERAÇÕES SÓBRE A TRANSMISSÃO E O BLOQUEIO NEUROMUSCULAR PRÉ-SINÁPTICOS

DR. FRANCIS F. FOLDES (*)

AP2322

Partindo dos experimentos clássicos de Masland e Wigton (71) e de Feng e Li (42, 43) Riker e assoc (81, 82, 83, 90, 92) e outros (8, 9, 46, 47, 53, 54) demonstraram conclusivamente que a ação de drogas facilitadoras (e.g. neostigmina, edrofônio), agentes bloqueadores n.m. despolarisantes (e.g. SCh, C 10) e não despolarisantes (e.g. d-Tc, galamind) na junção n.m. não se limitam a membrana postsin., mas que estes compostos também afetam a terminação do nervo motor. Sob condições experimentais adequadas (e.g. injeção i.a. próxima) doses de agentes facilitadores (9, 71) e despolarisantes (92) podem provocar atividade elétrica repetitiva antidrômica (DiA) mesmo sem estimulação ortodrômica e podem modificar o potencial esfático antidrômico simples que acompanha um estímulo único, para atividade elétrica repetitiva (PDR) (92). Após uma demora de cerca de 1 msec a PDR no nervo é acompanhada por PDR sincrônica no músculo (9, 92). Sem PDR no nervo nunca se observa PDR no músculo. A DiA e a PDR obtidas por drogas facilitadoras e despolarisantes pode ser bloqueada por doses de d-Tc (71, 92) ou galamina (99) que tenham pouco efeito sobre a transmissão n.m. A DiA também é inibida por doses bloqueadoras n.m. de agentes despolarisantes (9). As doses de drogas facilitadoras e despolarisantes capazes de provocar uma atividade elétrica antidrômica máxima no nervo motor causa pequeno ou nenhum aumento na frequência dos potenciais de miniatura placa (m.e.p.p.); em outras palavras, causam uma despolarização mínima ou nenhuma modificação da membrana présin. A d-Tc (10^{-8} g/ml) causa uma redução significativa (44 por cento) na frequência dos m.e.p.p. (46).

O mecanismo mais provável para o aparecimento de atividade repetitiva antidrômica no nervo motor é o aparecimento de um "potencial gerador" (83, 99) entre a membrana présin. da terminação nervosa amielínica e o primeiro nódulo de Ranvier do axônio mielinizado. Este potencial é produzido pelo aumento no tamanho e duração dos após potenciais da membrana présin. (100, 101) ou pela despolarização parcial do primeiro nódulo de Ranvier (53). A relação temporal entre a atividade antidrômica repetitiva no nervo e a atividade repetitiva elétrica do músculo é altamente sugestiva mas não é ne-

(*) Do Departamento de Anestesiologia do Hospital e do Centro Médico Montefiore e Colégio de Medicina Albert Einstein, Nova York, N. I.

cessariamente prova definitiva de uma relação causa-efeito entre os dois eventos.

Devido a sensibilidade das estruturas présin. aos agentes despolarisantes e não despolarisantes ser maior (afetada por doses menores) do que as da membrana postsin., foi sugerido que o local de ação dos bloqueadores n.m. é a terminação do nervo motor (81, 82, 83, 90, 92). Em vista da evidência experimental atualmente existente esta afirmativa não parece ser justificada. Não é impossível que as ações présin. dos agentes despolarisantes e não despolarisantes possa contribuir para o aparecimento de bloqueio n.m., mas até que seja provado em contrário a membrana postsin. pode ser considerada como o local principal de ação bloqueadora n.m. dos agentes despolarisantes e não despolarisantes.

É geralmente aceito que os agentes bloqueadores neuromusculares (n.m. do tipo amônio quaternário, nota 1), produzem paralisia muscular por prevenirem a interação do transmissor químico, acetilcolina (ACh), liberada na terminação nervosa, com receptores colinérgicos específicos da membrana muscular (24,25,43,44,63,77). Também é amplamente aceito que a neostigmina (pröstigmina) e outros antagonistas dos agentes bloqueadores n.m. não despolarizantes [e.g. edrodônio (Tensilon)] atuem em virtude de sua atividade anticolinesterásica (anti CHE). Acredita-se que, em presença de anti CHE, a ACh acumulada desloca por competição os agentes bloqueadores n.m. dos receptores colinérgicos da membrana pós-sináptica (postsin) e torna possível o restabelecimento da transmissão n.m.

Nos últimos 30 anos, a começar com os experimentos clássicos de Masland e Wigton (71), tornou-se conhecida uma considerável evidência experimental, indicando que a ação dos agentes bloqueadores n.m. (45,46,47,54,71,85,96) e de seus antagonistas (8,10,41,42,56,57,71,84,85) ao nível da junção n.m. não fica limitada a membrana postsin. Foi sugerido que não somente os agentes bloqueadores n.m. e seus antagonistas, mas também o transmissor fisiológico, ACh, possa também

Nota 1 — Serão usadas as seguintes abreviações: ACh (Acetilcolina) ACCh (Colinacetiltransferase); CHE (Colinesterase); C 10 (Decametônio); DiA (Atividade repetitiva induzida por droga); D-Tc (D-Tubocurarina); e.p. (Placa terminal); e.p.p. (Potencial de placa terminal); HC₃ (Hemicolinio); i.a. (Intra-arterial); i.v. (Intra-venoso); MEPP (Potencial miniatura de placa terminal); n.m. prep (Preparação neuro muscular); SRN d.i.a.s. prep (Preparação nervo frênico diafragma); PDR (Atividade repetitiva pós droga); CSIN (Pós sináptico); PTL (Atividade repetitiva pós tetânica); presin (Pré sináptico); subsin (Subsinático); SCH (Succinilcolina). — Nota do tradutor — As letras das abreviaturas foram conservadas como no original.

atuar na terminação do nervo motor (^{61,82,85}) e provavelmente também em outros locais (e.g. ganglionar) pré-sinápticos (presín) (^{10,57}).

Para melhor compreensão das ações présin. dos agentes bloqueadores n.m. e de seus antagonistas é essencial uma breve revisão da anatomia da junção n.m. e dos componentes présin. da transmissão n.m.

ANATOMIA SUBMICROSCÓPICA DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

A junção n.m. consiste de uma parte neural, a terminação do nervo motor, e uma parte muscular, que é uma porção anatômica e funcionalmente diferenciada da fibra muscular, freqüentemente chamada placa terminal, (e.p.). As duas partes são separadas por uma fenda com cerca de 200 a 250 A° de diâmetro, visível claramente com o microscópio eletrônico. Na discussão que se segue será usada a nomenclatura recomendada por Hubbard (⁵¹). De acôrdo com esta nomenclatura, o termo présin. refere-se a terminação do nervo motor. A parte de músculo que se encontra diretamente abaixo da terminação do nervo motor e que está separada dêste pela fenda sináptica é chamada de área subsináptica (subsin.), usando-se o termo postsin. como de designação geral para a porção muscular que está em volta da área subsin. Os termos pré-juncional e présin. são idênticos e muitos investigadores se referem a área subsin. como aparelho subneural (⁵⁶).

As investigações de Couteaux com o microscópio eletrônico (²³) revelaram que na junção n.m. de mamíferos, a área subsin. apresenta numerosas dobras que resultam na formação de fendas sinápticas secundárias. Estas fendas secundárias são invadidas pelos ramos terminais de elementos présin. Esta disposição cria uma área de superfície maior para a interação do transmissor químico, ACh liberado nos locais présin., com os receptores localizados na membrana subsin.

A área présin. se caracteriza pela presença de numerosas vesículas sinápticas (^{28,32,87}). Estas são pequenos corpos esféricos com cerca de 500 A° de diâmetro de uma espessura de cerca de 50 A°. Também estão presentes mitocôndrias em maior número na área presináptica do que nas partes adjacentes do axônio (⁵¹). A concentração das vesículas é maior na vizinhança imediata da membrana présin. e especialmente naquelas partes da membrana que se encontram opostas as fendas juncionais subsin. acreditando-se serem as áreas de

liberação para a ACh (⁵²). O número de vesículas que parecem tocar ou se fundir com a membrana présin. é muitas vezes maior nesta, do que em outras partes da membrana. O número de vesículas por μ^3 foi avaliada como sendo da ordem de 3.000 (⁵¹).

De acôrdo com Hubbard (⁵¹) o soma neural parece ser o local de formação das vesículas, das mitocôndrias e das enzimas relacionadas com a síntese da ACh. Estes elementos são transportados por um mecanismo desconhecido aos locais présin. e a ACh é sintetizada e armazenada nas vesículas, nestes locais.

A produção de vesículas e a sua concentração na área présin. estão correlacionadas com a intensidade de liberação do transmissor. Verificou-se que o número de vesículas estava aumentado após estimulação prolongada de baixa frequência (⁵⁵) e diminuída após estimulação prolongada de alta frequência (⁵²).

SÍNTESE, ARMAZENAMENTO E LIBERAÇÃO DE ACETILCOLINA

A ACh é sintetizada na porção terminal do nervo motor de vertebrados (⁵¹) pela acetilação da colina, pela colina acetiltransferase (colina acetilase; ChAc) (⁷⁴). A ChAc está presente na medula, nas raízes motoras e nos troncos dos nervos motores (^{48,49}). A ChAc é provavelmente uma enzima citoplasmática pois a ACh é sintetizada no citoplasma (⁵¹).

A ACh sintetizada é transferida para as vesículas e aí armazenadas sendo liberada destas vesículas para a fenda subsin. (⁴) em quantidades bastante uniformes, chamadas "quanta" (⁵⁴).

O conteúdo calculado de ACh num quanta é de cerca de 4 a 5 x 10⁴ moléculas (⁵¹). Esta é mais ou menos, a quantidade de ACh que pode ser acomodada numa esfera de 500 Å de diâmetro e 50 Å de espessura de parede (¹⁸). A validade deste número é corroborada pelo achado de que o efeito postsin. de um quantum, o potencial de placa terminal miniatura (m.e.p.p.) (³⁸), pode ser reproduzido pela aplicação iontoforética de uma quantidade similar (10⁵ moléculas) de ACh (⁷²).

A ACh citoplasmática não é liberada seja espontaneamente ou por impulsos nervosos mesmo quando sua concentração está muito aumentada em presença de um anti ChE (⁵¹). Este "surplus" de ACh do citoplasma na ausência de anti ChE é hidrolizada pela acetil-ChE presente na superfície externa das vesículas (^{103,104}).

Nem toda a ACh armazenada na fibra nervosa terminal está em condições de igualdade para liberação imediata. Existem pelo menos dois ou talvez três diferentes reservatórios da acetilcolina (³⁹). O primeiro destes consiste na ACh armazenada provavelmente nas vesículas na vizinhança imediata da membrana pré-sin. Como a ACh imediatamente disponível se torna exaurida (e.g. durante estimulação mecânica) ela é reabastecida de um reservatório secundário de unidades liberáveis (³⁷). Além disso há indicações para a existência de uma terceira fonte de ACh não liberável que pode ser convertida para as unidades liberáveis (quanta) numa velocidade constante (³⁷).

Ja foi afirmado que o fator determinante da capacidade de ACh disponível era a velocidade com que as vesículas na vizinhança da membrana pré-sin. eram substituídas pela migração das vesículas. A evidência experimental recente obtida por diversos investigadores (⁵¹) não foi capaz de confirmar esta afirmativa. É possível (³⁷) que o fator de limitação seja um material de atuação na superfície que aparece com certa velocidade limitada (³⁷). Estudos feitos com C¹⁴ marcado da ACh e observando-se a velocidade de recuperação da transmissão n.m. após o término de envenenamento por hemicolinio (HC₃) indicam que a ACh recém-sintetizada está preferentemente ligada nos quanta prontos para liberação.

Registros eletrofisiológicos indicam que mesmo na falta de um impulso nervoso, a ACh é liberada continuamente em quantidades relativamente uniformes (quanta) (⁵⁰), na membrana pré-sin. A interação da ACh liberada com os receptores específicos da membrana subsin., modifica a permeabilidade de Na⁺ e K⁺ numa área circunscrita ocasionando o aparecimento de um pequeno potencial localizado, chamado m.e.p.p. (³⁸). As propriedades do m.e.p.p. são bastante semelhantes as do potencial de placa terminal (e.p.), exceto em sua amplitude que é da ordem de 0.5 a 1.5 m.v.; assim por exemplo o m.e.p.p. tem as mesmas características elétricas, necessidades iônicas e respostas farmacológicas do que o e.p.p. A frequência do m.e.p.p. depende da velocidade de liberação espontânea de quanta de ACh e sua amplitude, do conteúdo de ACh dos quanta e das sensibilidades da membrana subsin. às influências despolarizantes. O m.e.p.p. primeiramente observado em preparação neuromuscular de rã (prep n.m.) (³⁸) foi mais tarde também demonstrado em preparação n.m. humana isolada (³⁵). Os vários fatores (e.g. anti ChE, agentes bloqueadores n.m., toxina botulínica, alterações iônicas, correntes despolarizantes ou hiper-

polarizantes) que influenciam as propriedades do m.e.p.p. foram resumidas por Eccles (31).

Foi obtida evidência adicional para mostrar a liberação espontânea de quanta, pela medida de conteúdo de ACh no líquido de perfusão de prep n.m. na ausência de estimulação nervosa (62,93).

A intensidade de liberação espontânea de quanta de ACh é diminuída mas não abolida quando falta a concentração adequada de Ca^{++} . O limiar de concentração de Ca^{++} necessário para que a liberação espontânea de quanta não seja modificada na junção n.m. de mamíferos é cerca de $10^{-4}M$ ($0.1 \text{ mM} = 0.2 \text{ mEq/l}$) (51).

Quando a terminação présin. do nervo motor é despolarizada por um potencial de ação nervoso, ocorre mais de uma centena de aumento rápido no número de quanta liberados (59). O efeito despolarizante conjunto de numerosos quanta liberados simultaneamente e sua combinação com receptores específicos na membrana subsin. produzem modificações significativas na permeabilidade iônica e provocam o aparecimento de e.p.p. Quando o e.p.p. atinge a uma amplitude crítica (cerca de 45 mV) inicia-se a despolarização e o desenvolvimento de potencial de ação, que por sua vez, através de mecanismo complexo, pouco conhecido, desencadeia a contração muscular (95).

Por meio de técnicas adequadas (e.g. diminuição da concentração de Ca^{++} ou aumento de Mg^{++}) o e.p.p. pode ser desdobrado em unidades que são idênticas aos m.e.p.p. (25,26). Desde que o m.e.p.p. é produzido pela liberação de 1 quantum, esta técnica torna possível calcular o número de quanta que produz o e.p.p. Este número, calculado como sendo cerca de 300 (22) é também chamado de "conteúdo quantal" do e.p.p. Segue-se que a amplitude do e.p.p. pode ser usada para medir a quantidade (número de quanta) de ACh liberada pelo impulso nervoso (26).

Apesar da liberação espontânea de ACh ser somente diminuída, mas não completamente abolida na falta de Ca^{++} , o aumento intenso e sincrônico da descarga de ACh produzido pelo potencial de ação do nervo não pode ocorrer quando faltar uma concentração adequada de Ca^{++} . O limiar da concentração de Ca^{++} no líquido extracelular para este efeito é cerca de $10^{-4}M$ (34,50).

Parece que a Ca^{++} é essencial para a ligação do impulso nervoso com o mecanismo responsável pela liberação de ACh (51). É provável que o Ca^{++} , talvez em combinação com uma substância desconhecida, seja absorvido as superfícies pré-sinápticas e entre na terminação da fibra nervosa

após a chegada do potencial de ação do nervo (⁵¹). Acredita-se que o Ca^{++} seja essencial para a ativação dos locais de recepção da membrana présin. que interatuam com locais receptores complementares das vesículas e que por êsse meio provocam a liberação de ACh na fenda sináptica (^{27,51,59}).

Além do Ca^{++} a liberação quantal présin. de ACh é também influenciada por numerosos outros fatores. Um dêste é a freqüência de estimulação. Embora a reserva total de ACh seja suficiente para a transmissão de muitos milhares de impulsos (^{36,37}), somente, uma pequena parte suficiente para a transmissão de, relativamente, poucos impulsos, está em condições para liberação imediata (⁶⁵). Quando há uma freqüência fisiológica de estimulação o armazenamento de quanta prontamente disponível pode ser reabastecido continuamente a partir dos reservatórios secundários de modo que, mesmo durante estimulação prolongada, não há decréscimo no número de quanta liberado e nem na modificação da transmissão n. m.

Durante a estimulação tetânica, no entanto, dois processos opostos influenciam a liberação fracional (quantidade liberada por um impulso nervoso simples) de ACh (⁹⁵). Um dêstes é o aumento da liberação fracional de ACh, cuja extensão e duração é limitada pelo segundo processo, isto é, a depleção progressiva dos reservatórios de ACh prontamente disponível (^{36,37}). O resultado disto é o declínio progressivo da amplitude (conteúdo quantal) do e.p.p. (queda inicial tetânica). A liberação fracional de ACh aumentada é mantida certo tempo após o término do tétano e é responsável pelo fenômeno de facilitação pós-tetânica (⁵¹).

ATIVIDADE REPETITIVA EM NERVOS MOTORES

Quando um nervo motor é estimulado elêtricamente por um choque simples próximo da junção n.m., pode-se registrar um potencial antidrômico simples desde a porção distal da raiz motora correspondente até próximo da medula (⁸⁴). Êste potencial antidrômico principal é acompanhado por um grupo de pequenos potenciais de ação após 2 a 4 mseg. Esta descarga secundária é a resposta efática (^{32,66}) provocada pela invasão na terminação nervosa pela somação de potenciais de ação das fibras musculares sincrônicamente estimuladas (^{9,15}). O ponto de estimulação do nervo motor pelos potenciais de ação musculares não é a terminação amielínica (membrana présin.) (¹⁰²), mas provavelmente o primeiro nódulo de Ranvier (⁵³). É possível, com uma técnica elegante

desenvolvida por Standaert (89), registrar potenciais antidrômicos e potenciais de ação muscular, simultaneamente, in situ, em um neurônio e sua unidade motora correspondente (Fig. 1). Após a aplicação de corrente de alta frequência

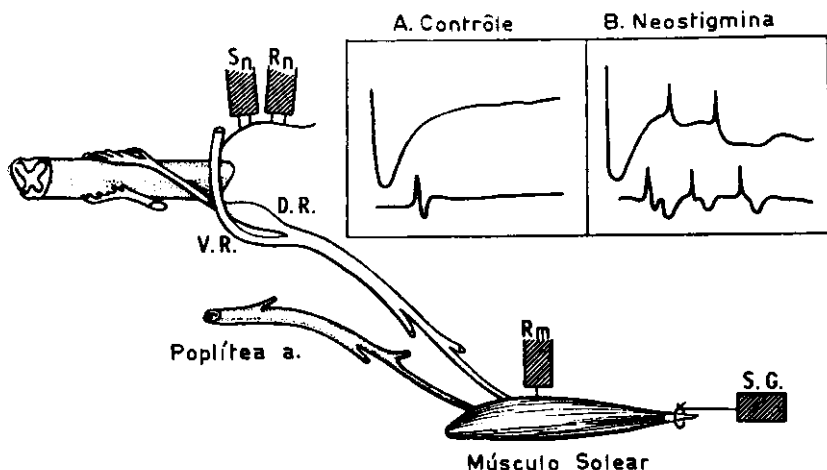


Fig. 1 — Técnica «par cruzado» (matched pair) para medida simultânea dos eventos pré e pós-juncionais.

Rn e Sn (eletrodos de registro e de estimulação na fibra isolada da raiz ventral; V.R. (raiz ventral) D.R. (raiz dorsal); Rm (eletrodo de registro no músculo); sg. (pêso de tensão). Nos encizos A e B o traçado de cima é da atividade elétrica do nervo e o de baixo do músculo, após um único estímulo. Notar que após a neostigmina a atividade elétrica se torna repetitiva (PDR) em ambos, nervo e músculo. Para explicação maior, veja o texto (de R. Ker e C. Amato «Pharmacology of motor nerve terminals» (83)).

(400/seg) (89), que condicione os estímulos, um estímulo simples pode provocar ambos os potenciais repetitivos, o de ação muscular e o antidrômico (74,89,101). A partir da relação temporal, isto é, o tempo necessário para a chegada dos impulsos antidrômicos e ortodrômicos aos seus respectivos eletrodos registradores Standaert (89), concluiu que os impulsos antidrômicos são gerados na terminação nervosa motora! Postulou ele (89,90) que a atividade repetitiva antidrômica é causada por um “potencial gerador” que aparece após estimulação tetânica entre as terminações nervosas amielínicas, onde a hiperpolarização pós-tetânica (30,67) é mais prolongada do que no axônio mielinizado. Standaert (89) acredita que a atividade repetitiva pós-tetânica (PTR) seja mantida enquanto a diferença de potencial entre as porções mielinizadas

e as amielinizadas excedem um limiar de sensibilidade (reobase) do último nódulo de Ranvier. O nódulo de Ranvier é desprovido de mielina e por isso oferece menor resistência a corrente gerada na terminação nervosa motora.

A potencialização pós-tetânica da tensão de contração no músculo do gato mas não em seu gastrocnêmio, foi também atribuída ao PTR na terminação nervosa que é transmitido ao músculo (⁸¹).

ACÇÃO PRÉ-SINÁPTICA DE DROGAS E TRANSMISSÃO NEURO-MUSCULAR

Nos últimos trinta anos, acumulou-se considerável evidência experimental indicando que tanto o transmissor fisiológico, ACh (⁸⁰), como muitas drogas (e.g., anti-ChE) que facilitam (drogas facilitadores) ou inibem (e.g., bloqueadores n.m.) a transmissão n.m., atuam em locais présin. (⁸³).

Inicialmente foi relatado por Masland e Wigton em 1940 (⁷¹) que a contração muscular provocada pela injeção venosa (i.v.) de neostigmina em gatos se acompanha de impulsos antidrômicos repetitivos que podem ser registrados na porção distal da raiz motora correspondente seccionada perto da medula. Verificaram que tanto a contração muscular como a descarga antidrômica repetitiva poderiam ser abolidas por pequenas doses de curare que não tinham praticamente efeito na transmissão n.m. Seccionando o nervo motor distalmente a seu ponto de estimulação ou interrompendo sua condução com cocaína, não há prevenção da condução ortodrômica entre o local da estimulação e o lado proximal cortado ou do local de aplicação da cocaína, mas previne o bombardeio repetitivo antidrômico, induzido por neostigmina. Concluíram destes estudos que os impulsos antidrômicos se originam na terminação nervosa e obtiveram resultados similares com injeções arteriais (i.a.) de ACh, independentemente de Masland e Wigton (⁷¹), Feng e Li (^{41,42}) fizeram observações semelhantes.

Por mais de quinze anos após as experiências clássicas de Maslang e Wigton houve pouco interesse na acção présin. das drogas capazes de facilitar ou inibir a transmissão n.m. Nôvo ímpeto foi dado a pesquisa nesta área pelo trabalho de Riker e seus associados (^{84,86,89,90,91,100,101,102}).

MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO DA ACÇÃO PRÉ-SINÁPTICA DAS DROGAS

Muitas investigações sobre a acção pré-sináptica das drogas utilizam técnicas que permitem o registro simultâneo

dos eventos pré e postsin. Um técnica descrita por Maslang e Wigton (71) e outras (41) possibilitaram o registro de impulsos nervosos antidrômicos *in situ* no gato. Esta técnica foi mais elaborada por Riker e al. (84), Werner (100) e Standaert (89,90), que desenvolveu a preparação de "par cruzado" (83). Esta técnica permite o registro simultâneo dos eventos elétricos na terminação nervosa motora e na placa terminal muscular e a medida da tensão muscular e contração (Fig. 1). O método foi adaptado para a preparação *in vitro* diafragma-nervo frênico do rato, por Barstad (1), Barstad e Lilleheil (2) e outros (19,20,54,79). Na preparação de Barstad (1) as fibras musculares são cortadas em ambos os lados da e.p. até uma distância que evite a contração durante a estimulação indireta. Isto previne o deslocamento dos microeletrodos inseridos na fibra muscular na região da e.p. e permite o registro simultâneo dos eventos pré e postsin. Uma técnica engenhosa feita por Galindo (46) também torna possível a medida da tensão da contração, sem o deslocamento dos microeletrodos intracelulares.

Os trabalhos de Martin (89), Standaert (89) e Elmquist e Quastel (37) e a apreciação matemática feita por estes investigadores para a avaliação de significância de seus dados, contribui também para a investigação sobre as ações farmacológicas presin. de drogas capazes de facilitar ou inibir a transmissão n.m.

Parâmetros observados — os vários parâmetros observados por diferentes investigadores na verificação da ação presin. das drogas incluem; a — interferência com a síntese da ACh; b — velocidade de mobilização do transmissor; c — reservatórios rapidamente disponíveis de ACh; d — tamanho médio dos quantas; e — liberação espontânea dos quanta; f — conteúdo quantal do e.p.v.; g — fração de ACh disponível liberada pelo primeiro impulso nervoso; h — alteração do potencial présin. de membrana; i — PTR atividade repetitiva após droga (PDR); e — atividade repetitiva induzida por droga (DIA).

Para compreensão da discussão que se segue será adotada a definição de drogas facilitadoras proposta por Riker e Standaest (85). De acordo com estes autores, as drogas facilitadoras aumentam a tensão de contração muscular de músculo esquelético estimulado indiretamente, antagoniza os agentes bloqueadores n.m. não despolarizantes, e melhora a performance muscular na miastenia gravis. A maioria das drogas, mas nem todas (e.g. 3-hidroxifenildietilamonio) (84,85) podem provocar fasciculação espontânea. Do mesmo

modo a maioria, mas nem tôdas (e.g. 3-hidroxiifenildietilamonía (84), quinidina, alcalóides do veratrum) são inibidores potentes da acetil-ChE.

Ao contrário, as drogas inibidoras podem ser definidas como compostos que, seja imediatamente e em doses relativamente pequenas (e.g. d-tubocurarina (d-Tc) ou após estimulação inicial (e.g. decametônio), inibem a força de contração muscular do músculo estimulado indiretamente, antagoniza os efeitos de drogas facilitadoras e deteriora a performance na miastenia gravis. Os efeitos présin. das drogas inibidoras serão discutidos sob dois sub-títulos: aquelas que primeiro estimulam a transmissão n.m. serão chamadas de despolarizantes e aquelas que não apresentam estimulação inicial serão chamadas de agentes não despolarizantes.

Tornar-se-á evidente da discussão que se segue que não há uma linha abrupta de demarcação entre drogas facilitadoras e inibidoras. Assim, por exemplo, a neostigmina (83) ou o metoxiambenônio (5,8,56) ou a SCh (92) podem produzir tanto facilitação como bloqueio n.m.

Síntese da acetilcolina — Várias substâncias podem evitar a síntese da ACh, inibindo a ChAc essencial para êste processo ou tornando inviável a colina para a ação enzimática (e.g. HC₃) (89,88). Ambos os mecanismos foram implicados com referência a compostos que demonstraram ter atividades présin. Assim, foi relatado que o agente despolarizante decametileno-bis-(hidroxietyl) dimetilamônio pode ter um efeito tipo HC₃. Também foi sugerido que a d-Tc pode inibir por competição a captação da colina pela terminação nervosa (79) ou pela ChAc. (3).

Reservas facilmente disponíveis de acetilcolina — As reservas facilmente disponíveis de ACh podem ser calculadas (37) a partir do conteúdo de quanta do primeiro e.p.p. após estimulação indireta rápida (100/seg). Esta reserva representa somente uma fração da reserva total liberável de ACh. A medida que vai sendo usada vai ocorrendo uma substituição contínua de um reservatório secundário maior (37). Baixas concentrações (10⁻⁷M) de compostos despolarizantes aumentam e os compostos não despolarizantes diminuem as reservas facilmente disponíveis de ACh.

Velocidade de mobilização do transmissor — A velocidade de mobilização do transmissor (AVh) pode ser definida como a velocidade com que as reservas facilmente disponíveis de ACh são recarregadas a partir de reservatórios secundários. Pode ser calculada multiplicando-se por 100 o conteúdo médio de quantum dos últimos 20 e.p.p. obtidos por um conjunto

de 40 estímulos aplicados com uma velocidade de 100/seg. (^{37,54}). Na preparação *in vitro* de "tenuissimus" de gato há um aumento por 10^{-6} M de C10 (⁶) e uma diminuição na preparação nervo fren.-diafr. do rato com 4×10^{-7} g/ml (⁵⁴) ou mesmo com concentração mais baixa (10^{-8} g/ml) de d-Tc (⁴⁶).

Liberção espontânea de quanta — A liberação espontânea de quanta pode ser avaliada a partir da frequência de m.e.p.p. Pode ser aumentada no gato por 10^{-9} M a 10^{-7} de C10 (⁹) e diminuída por 1.6×10^{-8} M de d-Tc.

Tamanho médio de quantum — O tamanho médio dos quantum (conteúdo de ACh de um quantum) pode ser avaliado a partir da amplitude de m.e.p.p. Pode ser diminuído tanto por 10^{-7} M de C10 (⁶) como por 1.6×10^{-8} M de d-Tc (⁴⁶).

Conteúdo quantal do potencial de placa terminal — O conteúdo médio quantal do e.p.p. (números de quanta liberados por um impulso nervoso único) pode ser calculado a partir das amplitudes dos e.p.p. e do tamanho dos quantum. O parâmetro é diminuído pela ACh (^{21,53}), aumentado pelos anti-ChE e usualmente diminuído tanto pelos agentes despolarizantes (⁴⁷) como pelos não despolarizantes (⁴⁶).

Fração da reserva de acetilcolina liberada pelo primeiro impulso nervoso — A reserva facilmente disponível de ACh dividida pelo conteúdo do médio quantal do e.p.p. indica a fração de reserva avaliável liberada pelo primeiro impulso nervoso. Este parâmetro é aumentado na preparação nervo fren.-diafr. de rato *in vitro* por 10^{-6} g/l e na preparação do "tenuissimus" do gato por 7.2×10^{-7} M de d-Tc e diminuída por 10^{-7} M de C10 (⁶).

Atividade repetitiva pós tetânica — Após condicionamento indireto, por estimulação tetânica de um nervo motor, um estímulo simples provoca uma atividade repetitiva tanto no nervo como no músculo (^{40,100}). Este fenômeno é conhecido como PTR e pode ser observado em músculos "lentos" (solear; vermelho) mas não nos músculos "rápidos" (gastrocnêmio; branco) do gato (^{41,91}). O aparecimento, a intensidade e a duração da PTR depende primariamente da frequência e duração do tétano condicionante (⁸⁹); A PTR do nervo precede a do músculo em cerca de 1 mseg e ambas se origina na terminação do nervo motor. A PTR é antagonizada por doses de compostos despolarizantes (e.g. ACh) (⁹²) e não despolarizantes que tenham pouco ou nenhum efeito na transmissão n.m. Concentração subanestésicas de agentes anestésicos locais também abolem a PTR (⁹⁶).

Atividade repetitiva após drogas — A administração preliminar de drogas facilitadoras (e.g. neostigmina) da mesma maneira que a estimulação tetânica prévia produz atividade

repetitiva de um impulso nervoso simples tanto no músculo (14) como antidromicamente no nervo (71). Este fenômeno é conhecido como PDR e pode ser observado após administração i.a. de ACh, neostigmina e ambenônio (9) outros compostos amoniacais quaternários (84) após administração i.v. de agentes despolarizantes (9).

Atividade induzida por drogas — Compostos facilitadores e despolarizantes podem produzir DiA mesmo sem estimulação nervosa tanto no nervo como no músculo. A DiA no nervo motor sempre se acompanha por atividade repetitiva semelhante no músculo. O reverso não é verdadeiro. A DiA no músculo pode ocorrer sem DiA simultânea no nervo (92). A DiA pode ser produzida por injeção i.a. de ACh por injeção i.a. ou i.v. de anti-ChE (9,71) e por agentes bloqueadores n.m. (9,92).

LOCAIS E MECANISMOS DE AÇÃO PRE-SINÁPTICOS DAS DROGAS

De acordo com Karczmar e ass. (10,57,58) existem pelo menos três locais de ação possíveis de drogas facilitadoras e inibidoras na terminação do nervo motor. O primeiro destes locais está, presumivelmente, na terminação não mielinizada da fibra nervosa (membrana présin.). Embora as drogas facilitadoras (e.g. neostigmina, edrofônio, ambenônio) (8,13) produzam uma despolarização mínima (1 a 3 mV) da membrana présin., nem a PDR nem a DiA podem ser explicadas por esta pequena alteração de potencial présin. Foi sugerido que as drogas facilitadoras provocam, na membrana présin., condições que são favoráveis ao aparecimento e manutenção de pós potenciais (after potenciais) negativos (101). Devido ao prolongamento dos pós potenciais negativos, aparece uma diferença de potencial entre as partes mielinizadas e não mielinizadas do axônio. A corrente resultante invade o axônio provavelmente ao nível do primeiro nódulo de Ranvier (83) e inicia ambos os impulsos orto e antidrômicos que produzem a PDR. Subseqüentemente foi postulado (89) que a PTR também é produzida pelo aparecimento de "potencial gerador" pela estimulação tetânica condicionada. A atividade repetitiva induzida por drogas facilitadoras quando não há estimulação nervosa (DiA) pode também ser devida ao desenvolvimento de uma diferença de potencial entre a terminação nervosa não mielinizada e as partes mielinizadas do axônio.

O local de captação da colina necessária para a síntese da ACh foi sugerido como sendo o terceiro local, no qual a droga pode exercer seus efeitos présin. (10). Este é o local

em que presumivelmente o HC₃ e a trietilcolina exercem seus efeitos.

As ações das drogas facilitadoras e despolarizantes, contudo, não se limitam necessariamente ao primeiro e segundo locais respectivamente. Existem indicações de que as drogas facilitadoras podem também atuar no segundo local (primeiro nódulo de Ranvier) e as despolarizantes, no primeiro local (terminação nervosa amielínica⁽⁵⁸⁾).

No que se relaciona com os agentes são despolarizantes (e.g. d-Tc) eles são antagonistas ativos em todos os três locais propostos. Já foi demonstrado que a d-Tc em concentração que produz apenas 20% de bloqueio n.m., previne a DiA de agentes tanto facilitadores como despolarizantes por períodos (45 a 60 min) que sobrepassam a ação bloqueadora n.m. (5 a 10 min)⁽⁹⁹⁾. Do mesmo modo, a d-Tc previne também a PDR produzida por drogas facilitadoras após estímulos ortodrômicos simples.^(71,90,102) Foi também relatado que a d-Tc inibe a captação da colina na terminação nervosa motora⁽⁷⁰⁾. Além disso, a d-Tc também reduz a liberação présin. do transmissor⁽⁵⁴⁾.

Já foi mencionado que existe uma diferença considerável de opinião a respeito do significado relativo dos efeitos dos bloqueadores n.m. nos locais présin. e postsin. para o aparecimento de bloqueio n.m. Muitas autoridades^(22,58,75,76,95,97,98) acreditam que o local de ação primário dos agentes bloqueadores n.m. é a membrana postsin. Riker e col^(81,82,83,90,92) e Galindo^(46,47) consideram que os efeitos présin. destes compostos são responsáveis primariamente por sua atividade bloqueadora n.m. Outros,^(45,54) adotam uma posição intermediária.

Riker e col baseiam sua hipótese na importância principal da terminação nervosa amielinizada como local de ação da ACh, das drogas facilitadoras e dos agentes bloqueadores n.m. despolarizantes e não despolarizantes, nas observações feitas sobre os efeitos destes compostos na DiA do nervo motor. Este grupo coletou uma quantidade impressionante de evidência convincente, posta em sumário recentemente por Riker e Okamoto⁽⁸³⁾ mostrando que a PTR⁽⁸⁰⁾, a PDR⁽⁹²⁾ e a DiA induzidas pela ACh⁽⁸²⁾ por drogas facilitadoras e agentes despolarizantes⁽⁹²⁾ se originam na terminação do nervo motor. Mostraram ainda que a DiA induzida por esses compostos se acompanhava de fenômenos elétricos repetitivos sincrônicos, fasciculações e usualmente um aumento da tensão de contração do músculo estimulado indiretamente⁽⁹²⁾. Da análise da relação temporal entre os eventos repe-

titivos no nervo e no músculo (^{91,92}) foi concluído que os eventos neurais precedem os eventos musculares e que a atividade repetitiva no músculo foi iniciada pela atividade repetitiva no nervo.

Foi demonstrado que a PTR é abolida pela d-Tc (⁹⁰), que a PDR induzida por compostos facilitadores (^{7,71,99}) ou despolarisantes (⁹²) e a DiA (⁹) são abolidas pela d-Tc e outros agentes bloqueadores n.m. não despolarisantes.

Standaert (⁹⁰) assinalou que as doses de d-Tc suficientes para inibir a PTR são cêrca de 25 vezes menores do que as que provocam diminuição semelhante da transmissão n.m. Deu ênfase também que após a administração i.v. do SCh em gatos, o efeito máximo na PTR, PDT e DiA ocorre com doses que apenas provocam cêrca de 50 a 60 por cento de bloqueio na transmissão n.m. (⁹²).

Riker e assoc. concluem, com base em seus achados experimentais que o provável local de ação principal da ACh injetada (^{81,82,90}) e de ambos agentes bloqueadores n.m. despolarisantes (⁹²) e não despolarisantes (⁹⁰) é a terminação do nervo motor.

Revisando os resultados de Riker e assoc. (^{81,82,83,90,92}) e de outros (^{8,9,46,47,53,54}) é evidente que os compostos facilitadores, os despolarisantes e os não despolarisantes têm, de fato, ações farmacológicas na terminação do nervo motor. Estas ações são claramente demonstradas em suas influências sôbre os vários tipos de DiA registrados no axônio motor. É também evidente que a DiA no nervo é acompanhada por atividade elétrica registrável nas fibras musculares correspondentes. Esta relação temporal, no entanto, não quer dizer necessariamente que exista uma relação causa-efeito entre os eventos nervosos e musculares. Assim, por exemplo, a SCh quase que invariavelmente produz DiA no músculo, mas apenas ocasionalmente no nervo (⁹²), e PDR no nervo pode ainda ser registrada em presença de bloqueio n.m. completo (⁹²).

Mesmo, que se aceite a possibilidade de relação causa-efeito entre os eventos elétricos repetitivos (PTR, PDR, DiA) no nervo e no músculo, isto não justifica a aceitação de que o local de ação primário de ação dos agentes bloqueadores n.m. despolarisantes ou não despolarisantes seja a terminação do nervo motor. A evidência contra esta afirmativa foi apresentada em detalhes por outros (⁵⁶). Somente alguns pontos principais sôbre isto serão mencionados aqui. Talvez o ponto mais importante seja a dosagem. As doses (^{in vivo}) (⁹²) e as concentrações (*in vitro*) (⁴⁷) dos agentes bloqueadores n.m. despolarisantes necessárias para abolirem os

eventos elétricos repetitivos antidrômicos no nervo motor sejam bastante diferentes daquelas necessárias para produzir bloqueio n.m. Assim por exemplo, Standaert e Adams (92) mostraram que a dose de SCh i.a. suficiente para um bloqueio completo da prep n.m. do solear de gato é cerca de 20 vezes maior do que a que abole completamente a PTR ou produz PDR ou DiA em maior número de fibras nervosas. Deve também ser enfatizado que embora o bloqueio por despolarização inicialmente seja caracterizado por despolarização profunda da membrana postsin. (e.p.) (16,94), as doses de SCh ou C10 que afetam profundamente os eventos elétricos antidrômicos, provocam pouca ou nenhuma despolarização da membrana postsin. (5,9). Da mesma maneira, doses de d-Tc que bloqueiam completamente e os efeitos antidrômicos de drogas despolarisantes, somente produzem 20% de bloqueio da transmissão n.m. (9) e a dose d-Tc que abole a PTR é cerca de 25% menor que a dose bloqueadora n.m. (90). A evolução no tempo das ações antidrômicas e bloqueadoras n.m. de ambos os agentes despolarisantes e não despolarisantes é também bastante diferente (9,90,92).

Os proponentes da hipótese de que o local principal de ação dos agentes bloqueadores n.m. tanto despolarisantes como não despolarisantes seja a terminação do nervo motor, baseiam sua afirmativa, em grande parte, no fato de que a terminação do nervo motor é afetada primeiro e por doses muito menores de concentrações destes agentes do que as necessárias para produzir bloqueio n.m. (99,92). Parece ser igualmente justificado, no entanto, usar este fato como argumento contra esta hipótese (56).

SUMMARY

PRESYNAPTIC CONSIDERATIONS IN NEUROMUSCULAR TRANSMISSION AND BLOCH

Starting with the classical experiments of Masland and Wigton (71) and Feng and Li (42, 43), Riker and his associates (81, 82, 83, 90, 92) and others (8, 9, 46, 47, 53, 54) have conclusively demonstrated that the actions of facilitatory drugs (e.g., neostigmine, edrophonium) and depolarizing (e.g., SCh, C10) and nondepolarizing (e.g., d-Tc, gallamine) n.m. blocking agents at the n.m. junction are by no means limited to the postsyn. membrane, but that these compounds also affect the motor nerve terminal. Under appropriate experimental conditions (e.g., close i.a. injection) doses of facilitatory (9, 71) and depolarizing (92) agents can cause repetitive antidromic electrical activity (DiA) in the absence of orthodromic stimulation and can change the single ephaptic antidromic potential that follows a single stimulus into repetitive electrical activity (PDR) (92). After about 1 msec delay the PDR in the nerve is usually followed by synchronous PDR in the muscle (9, 92). Without PDR in the nerve PDR in muscle is never

observed (92). DiA and PDR elicited by facilitatory and depolarizing drugs can be blocked by doses of d-Tc (71, 92) or gallamine (99) which have little effect on n.m. transmission. DiA is also inhibited by n.m. blocking doses of depolarizing agents (9). The doses of facilitatory or depolarizing drugs capable of eliciting maximal antidromic electrical activity on the motor nerve cause little or no increase in the frequency of the miniature endplate potential (m.e.p.p.) (9). In other words they cause little or no depolarization of the presyn. membrane. d-Tc (10-8 g/ml) caused a significant (44 percent) reduction of the frequency of the m.e.p.p. (46).

The most probable mechanism of the development of the repetitive antidromic activity on the motor nerve is the development of a «generator potential» (83, 99) between the presyn. membrane of the unmyelinated terminal nerve fiber and the first node of Ranvier of the myelinated axon. This potential is caused by the increase in the size and duration of the negative afterpotential of the presyn. membrane (100, 101) or the partial depolarization of the first node of Ranvier (53). The temporal relationship between the repetitive antidromic activity in the nerve and the repetitive electrical activity of the muscle is highly suggestive, but not necessarily definite proof of a cause-effect relationship between the two events.

Because of the sensitivity of the presyn. structures to both depolarizing and nondepolarizing agents is greater (affected by smaller doses) than that of the postsyn. (90, 92) membrane, it was suggested that the site of the n.m. blocking action of these compounds is the motor nerve terminal (81, 82, 83, 90, 92). In view of presently available experimental evidence this assumption does not seem to be justified. It is not impossible that the presyn. actions of depolarizing and nondepolarizing agents may contribute to the development of n.m. block, but until proven otherwise, the postsyn. membrane should be considered the primary site of the n.m. blocking action of both depolarizing and nondepolarizing agents.

REFERÊNCIAS

1. Barsted J A B -- *Experientia* (Basel) 18:379, 1962.
2. Barsted J A B, and G Lilleneheil -- *Arch Int Pharmacodyn Ther* 175:373, 1968.
3. Bhatnagar S P, and F C MacIntosh -- *Canad J Physiol* 45:249, 1967.
4. Birks R I, and F C MacIntosh -- *Canad J Biochem Physiol* 39:787, 1961.
5. Blaber L C -- *Brit J Pharmacol* 15:476, 1960.
6. Blaber L C -- *J Pharmacol Exp Ther* In press.
7. Blaber L C, and W C Bowman -- *Brit J Pharmacol* 20:326 1963.
8. Blaber L C, and D D Christ -- *Int J Neuropharmacol* 6:473, 1967.
9. Blaber L C, and J W Gode -- *Int J Neuropharmacol* 7:429, 1968.
10. Blader L C, and A G Karczmar -- *J Pharmacol Exp Ther* 156:55, 1967.
11. Blaschko H E Bulbring, and T C Chou -- *Brit J Pharmacol* 4:29, 1949.
12. Bowman W C, and B A Hemsworth -- *Brit J Pharmacol Chemother* 25:392, 1965.
13. Boyd I A, and A R Martin -- *J Physiol (London)* 132:61, 1956.
14. Brown G L -- *J Physiol* 89:220, 1937.
15. Brown M C, and P B C Matthews -- *J Physiol (London)* 150:332, 1960.
16. Burns B D, and W D M Paton -- *J Physiol* 115:41, 1951.
17. Burn J H, and M J Fand -- *Nature (London)* 184:163, 1959.
18. Canepa F G -- *Nature (London)* 201:184, 1964.
19. Chang C C, and C Y Lee -- *Brit J Pharmacol* 28:172, 1966.
20. Chang C C, T F Chen, and H C Cheng -- *J Pharmacol Exp Ther* 158:89, 1967.
21. Ciani S, and C Edwards -- *J Pharmacol Exp Ther* 142:21, 1963.

22. Cookson J C, and W D M Paton — *Anaesthesia* 24:395, 1969.
23. Couteaux R — *Proc Roy Soc B*, 158:457, 1963.
24. Dale H H, W Feldberg, and M Vogt — *J Physiol* 86:353, 1936.
25. Del Castillo J, and B Katz — *J Physiol* 124:553, 1954a.
26. Del Castillo J, and B Katz — *J Physiol* 124:560, 1954b.
27. Del Castillo J, and B Katz — *Progr Biophys* 6:121, 1956.
28. De Robertis E D P, and H S Bennett — *J Biophys Biochem Cytol* 1:47, 1955.
29. Diamond J — *J Physiol (London)* 145:611, 1959.
30. Douglas W W, and J M Ritchie — *Physiol Rev* 42:297, 1962.
31. Eccles J C — *The Physiology of Synapses*, p 29, Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer, 1964.
32. Eccles J C, B Katz, and S W Kuffler — *J Neurophysiol* 5:211, 1942.
33. Eccles J, and W V MacFarlane — *J Neurophysiol* 12:59, 1949.
34. Elmqvist D, and D S Feldman — *J Physiol* 181:487, 1965.
35. Elmqvist D, T R Johns, S Thesleff — *J Physiol* 154:602, 1960.
36. Elmqvist D, and D M J Quastel — *J Physiol* 177:463, 1965a.
37. Elmqvist D, and D M J Quastel — *J Physiol* 178:505, 1965b.
38. Fatt P, and B Katz — *J Physiol* 117:109, 1952.
39. Feldman D S — *Clin Anesth* 3:137, 1967.
40. Feng T P, T H Li, and Y C Ting — *Clin J Physiol* 14:55, 1939.
41. Feng T P, and T H Li — *Clin J Physiol* 16:37, 1941a.
42. Feng T P, and T H Li — *Clin J Physiol* 16:143, 1941b.
43. Földes F F — *Brit J Anaesth* 26:394, 1954.
44. Földes F F — *Acta Anaesth Scandinav Suppl XXV*, 207, 1966.
45. Freeman S E — *Brit J Pharmacol* 32:546, 1968.
46. Galindo A — *Fed Proc* 29:281 (Abstract) 1970a.
47. Galindo A — Personal communication, 1970b.
48. Hebb C — *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie* 15:55, 1963.
49. Hebb C O, K Konjevic, and A Silver — *J Physiol* 171:504, 1964.
50. Hubbard J I — *J Physiol* 158:507, 1961.
51. Hubbard J I — *Prog Biophys Mol Biol* 21:35, 1970.
52. Hubbard J I, and S Kwanbunbumpen — *J Physiol* 194:407, 1968.
53. Hubbard J I, R F Schmidt, and T Yokota — *J Physiol* 181:810, 1965.
54. Hubbard J I, D F Wilson, and M Miyamoto — *Nature (London)* 223:531, 1969.
55. Jones S F, and S Kwanbunbumpen — *Life Sci (Oxford)* 7:1251, 1968.
56. Karczmar A G — *Ann Rev Pharmacol* 7:241, 1967.
57. Karczmar A G, and S Nishi — *First International Symposium on Cell Biology and Cytopharmacology*, New York: Raven Press, 1970.
58. Karczmar A G, S Nishi, and L C Blader — *Acta Vitamin (Milano) In Press*, 1970.
59. Katz B — *Proc Roy Soc B* 155:455, 1962.
60. Katz B — *Nerve, Muscle and Synapse*. New York. McGraw-Hill, 1966.
61. Koelle G B — *J Pharm Pharmacol* 14:65, 1962.
62. Krnjevic K, and J F Mitchell — *J Physiol* 155:246, 1961.
63. Langley J N — *J Physiol* 39:235, 1909.
64. Liley A W — *J Physiol* 132:650, 1956.
65. Liley A W, and K A K North — *J Neurophysiol* 16:509, 1953.
66. Lloyd D P C — *J Neurophysiol* 5:153, 1952.
67. Lloyd D P C — *J Gen Physiol* 33:147, 1950.
68. MacIntosh F C, R I Birks, and P B Sastry — *Nature* 178:1181, 1956.
69. Martin A R — *J Physiol* 130:114, 1955.
70. Martin K — *J Physiol* 200:490, 1969.
71. Masland R L, and R S Wigton — *J Neurophysiol* 3:269, 1940.
72. Miledi R — *Discovery* 22:442, 1961.
73. Nachemsohn D — *Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity*. New York: Academic Press, 1959.

74. Nachmansohn D, and A L Machado — *J Neurophysiol* 6:397, 1943.
75. Nastuk W L — *Fed Proc* 26:1639, 1967.
76. Nastuk A L and R L Parsons — *J Gen Physiol* 56:218, 1970.
77. Paton W D M, and E J Zaimis — *Brit J Pharmacol* 4:381, 1949.
78. Potter L T — *Proc Physiol Soc* 13-14th Dec p.3, 1968.
79. Randic M, and D W Straughan — *J Physiol* 173:130, 1964.
80. Riker W F, Jr — *Arch Neurol* 3:488, 1960.
81. Riker W F, Jr — *In Biochemistry and Pharmacology of the Basal Ganglia*. New York, 1965.
82. Riker W F, Jr — *J Pharmacol Exp Ther* 152:397, 1966.
83. Riker W F, Jr, and M Okamoto — *Ann Rev Pharmacol* 9:173, 1969.
84. Riker, W F, Jr, J Roberts, F G Standaert, and H Fujimori — *J Pharmacol Exp Ther* 131:286, 1957.
85. Riker W F, Jr and F G Standaert — *Ann N Y Acad Sci*, 135:163, 1966.
86. Riker W F, Jr, G Werner, J Roberts, A S Kuperman — *J Pharmacol Exp Ther*, 125:150, 1959.
87. Robertson J D — *J Biophys Biochem Cytol* 2:381, 1956.
88. Schueler F W — *J Pharmacol Exp Ther* 115:127, 1955.
89. Standaert F G — *J Gen Physiol* 47:53, 1963.
90. Standaert F G — *J Pharmacol Exp Ther* 143:181, 1964a.
91. Standaert F G — *J Gen Physiol* 47:987, 1964b.
92. Standaert F G, and J E Adams — *J Pharmacol Exp Ther* 149:113, 1965.
93. Standaert F G, and W F Riker Jr — *Ann N Y Acad Sci* 144:517, 1967.
94. Straughan D W — *Brit J Pharmacol Chemother* 15:417, 1960.
95. Thesleff S — *Acta Physiol Scand* 34:218, 1955.
96. Ueda M, S Matsumura, S Kimoto, S Matsuda — *Jap J Pharmacol* 12:111, 1962.
97. Vere-Jones D — *Aust J Statistics* 8:53, 1966.
98. Waser P G — *Der Anaesthesist*, In press, 1970a.
99. Waser P G — *Ciba Foundation Symposium on Molecular Properties of Drug Receptores*. Churchill, London. In press, 1970b.
100. Werner G — *Fed Proc* 18:458, 1959.
101. Werner G — *J Neurophysiol* 23:171, 1960a.
102. Werner G — *J Neurophysiol* 23:453, 1960b.
103. Werner G — *J Neurophysiol* 23:401, 1961.
104. Whittaker V P — *Proc Nat Acad Sci U S A* 60:1081, 1968.