

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal

EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE DANTROLENE E AZUMOLENE EM β -
CICLODEXTRINA NA REGULAÇÃO DA CONTRATILIDADE MUSCULAR

ANANSSA MAÍRA DOS SANTOS SILVA

Rio de Janeiro
2014



EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE DANTROLENE E AZUMOLENE EM β -CICLODEXTRINA NA REGULAÇÃO DA CONTRATILIDADE MUSCULAR

Ananssa Maíra dos Santos Silva



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientador: Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zapata-Sudo

Rio de Janeiro
Dezembro/2014

Silva, Ananssa Maíra dos Santos

Efeito da incorporação de dantrolene e azumolene em β -ciclodextrina na regulação da contratilidade muscular / Ananssa Maíra dos Santos Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Ciências Biomédicas, 2014.

xvi, f. : 79 il. 31 cm ;

Orientadores: Roberto Takashi Sudo e Gisele Zapata-Sudo
Dissertação (Mestrado) – UFRJ, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2014.

Referências Bibliográficas: f. 68-79

1. Dantrolene. 2. Azumolene. 3. β -ciclodextrina. 4. Músculo Esquelético. 5. Hipertermia maligna. 6. Espasticidade. – Dissertação. I.Sudo, Roberto Takashi. II.Zapata- Sudo, Gisele. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. IV. Título.

EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE DANTROLENE E AZUMOLENE EM β -
CICLODEXTRINA NA REGULAÇÃO DA CONTRATILIDADE MUSCULAR

Ananssa Maíra dos Santos Silva

Orientador: Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zapata-Sudo

Tese Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Rio de Janeiro, 16 de Dezembro de 2014

Aprovada por:

Prof^a. Dr^a. Lucienne da Silva Lara Morcillo - ICB / UFRJ

Prof. Dr. Wagner Seixas da Silva - IBqM/UFRJ

Prof^a. Dr^a. Sabrina Calil-Elias - UFF

Prof^a. Dr^a. Margarete Manhães Trachez - UFF (Revisora)

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo - ICB / UFRJ (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Gisele Zapata-Sudo - ICB / UFRJ (Coorientadora)

Rio de Janeiro
Dezembro/2014

Aos meus pais, Antonia e Edson, por serem o meu modelo de dedicação ao trabalho, e à toda minha família e amigos pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo e Prof^a. Dra. Gisele Zapata Sudo pela oportunidade, dedicação e conhecimentos compartilhados durante a minha iniciação científica e mestrado.

Aos meus colegas dos Laboratórios de Farmacologia do Acoplamento Excitação-Contração Muscular e de Farmacologia Cardiovascular pela amizade.

À minha querida amiga Michele Cristina Santos da Silva, agradeço pela grande ajuda durante os experimentos iniciais e pela amizade.

À Dra Paula Lima do Carmo pela ajuda no começo desse trabalho, compartilhando conhecimento e experiência sobre o assunto

À revisora Dra Margarete Manhães Trachez e aos membros da banca examinadora Prof^a. Dr^a. Lucienne da Silva Lara Morcillo, Prof. Dr. Wagner Seixas da Silva e Prof^a. Dr^a. Sabrina Calil-Elias.

Ao CNPQ, FAPERJ, CAPES, INCT/INOFAR, CRISTÁLIA pelo apoio financeiro.

RESUMO

EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE DANTROLENE E AZUMOLENE EM β -CICLODEXTRINA NA REGULAÇÃO DA CONTRATILIDADE MUSCULAR

Ananssa Maíra dos Santos Silva

Orientador: Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zapata-Sudo

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

O dantrolene sódico (DS), descoberto por Snyder (1967) é prescrito para o tratamento da crise de hipertermia maligna (HM) e para o alívio da espasticidade muscular. O efeito do DS resulta do bloqueio do receptor de rianodina 1 (RyR1) com consequente redução da concentração mioplasmática de Ca^{2+} . Embora eficaz, o DS é pouco solúvel na água. Um análogo mais hidrossolúvel, azumolene sódico (Az), foi mais recentemente sintetizado e a sua equipotência com DS confirmada (Sudo et al, 2007). Este trabalho avaliou a atividade farmacológica de DS e Az incorporados em β -ciclodextrina (β -CD) na contratilidade de músculos esqueléticos em modelos *in vitro* e *in vivo*, na tentativa de se obter produto de fácil manuseio no tratamento da HM e outras doenças espásticas. Testes *in vitro* foram realizados em músculo extensor longo dos dedos (EDL) e solear (SOL) de camundongos Swiss machos expostos a concentrações crescentes de β -CD pura, DS, Az, DS β -CD e Az β -CD. Redução da amplitude dos abalos musculares foi utilizada para aferir a eficiência na contratilidade muscular. Da mesma forma, este parâmetro foi medido no músculo gastrocnêmio de cobaias após administração intravenosa para medir a atividade *in vivo*. Potencial ação hipotensora e cardiodepressora foi avaliado por meio da medida da pressão arterial em cobaias e pressão intraventricular sistólica (PVS) e diastólica (PVD), assim como, das suas derivadas máximas positivas (+dP/dt) e negativas (-dP/dt) em ratos Wistar machos. A eficiência na espasticidade foi avaliada em camundongos Swiss machos submetidos a secção do nervo ciático e tratados com β -CD, DS ou DS β -CD (25 mg/kg v.o.) pelo período de 7 dias. Diminuição da resposta contraturante induzida pela cafeína no EDL e SOL foi utilizada como parâmetro de eficiência para prevenir a espasticidade muscular. Os resultados

mostraram aumento da solubilidade de 6 e 30,3 vezes em relação à DS para DS β -CD e Az β -CD, respectivamente. DS e Az foram igualmente eficazes na redução dos abalos musculares no EDL, porém, a concentração inibitória média (CI_{50}) foi menor para o DS (1,6 μ M) comparada ao Az (7,3 μ M). A potência e a eficácia do Az não foi modificada pela incorporação em β -CD, porém, reduziu a do DS. O DS (CI_{50} = 9,8 μ M) e Az (CI_{50} = 9,0 μ M) foram igualmente potentes no SOL e estas atividades não foram modificadas pela incorporação em β -CD. DS β -CD (DI_{50} = 1,6 mg/kg) e Az β -CD (DI_{50} = 1,6 mg/kg) foram igualmente potentes na inibição dos abalos do gastrocnêmio e as suas administrações intravenosas aumentaram a pressão arterial média em cobaias. Administração intravenosa de DS, Az, DS β -CD e Az β -CD em ratos aumentou a PVS sem alterar a PVD e aumentou significativamente a +dP/dt e a -dP/dt. Tratamento oral com DS e DS β -CD durante 7 dias reduziu significativamente a contratura induzida pela cafeína no EDL e SOL desnervados. Esse trabalho concluiu que o aumento da solubilidade resultante da incorporação do DS e Az em β -CD representa avanço significativo no tratamento da HM e outras doenças que cursam com espasticidade muscular.

Palavras-chave: dantrolene, azumolene, β -ciclodextrina, músculo esquelético, hipertermia maligna e espasticidade,

ABSTRACT

EFFECT OF THE INCORPORATION OF DANTROLENE AND AZUMOLENE IN β -CYCLODEXTRIN IN THE REGULATION OF MUSCLE CONTRACTILITY

Ananssa Maíra dos Santos Silva

Orientador: Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zapata-Sudo

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Dantrolene sodium (DS), discovered by Snyder (1967) is prescribed for treatment of malignant hyperthermia crisis (MH) and for relief of muscle spasticity. The effect of DS results from ryanodine receptor type 1 (RyR1) blockade with consequent reduction of mioplasmatic Ca^{2+} concentration. Although effective, DS is poorly soluble in water. A more water-soluble analogue, azumolene sodium (Az) was more recently synthesized and its equipotency to DS has been confirmed (Sudo et al, 2007). This study evaluated the pharmacological activity of DS and Az incorporated into β -cyclodextrin (β -CD) in skeletal muscle contractility in *in vitro* and *in vivo* protocols, as an attempt to obtain an easier product to be use for the treatment of MH and other spastic diseases. *In vitro* tests were performed in extensor digitorum longus (EDL) and soleus (SOL) muscles of male Swiss mice exposed to increasing concentrations of pure β -CD, DS, DS β -CD, Az and Az β -CD. The reduction of muscle twitches was used to measure the efficiency of the compounds. Similarly, this parameter was measured in the gastrocnemius muscle of guinea pigs after intravenous administration to measure activity *in vivo*. Potential hypotensive and cardiodepressant action was assessed by measurement of blood pressure in guinea pigs and systolic and diastolic intraventricular pressure (SVP and DVP, respectively), as well as its positive and negative maximum differentiation (+dP/dt and -dP/dt, respectively) in male Wistar rats. The efficiency in spasticity was evaluated in male Swiss mice subjected to sciatic nerve section and treated with β -CD, DS or DS β -CD (25 mg/kg p.o.) for 7 days period. Decreased contracture response induced by caffeine in the EDL and SOL was used as efficiency parameter to prevent muscle

spasticity. The results showed increased solubility of 6 and 30.3-fold to DS β -CD and Az β -CD, respectively, in comparison to DS. DS and Az were equally effective in reducing muscle spasms in the EDL, however, the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was lower for the DS (1.6 μ M) compared to Az (7.3 μ M). The potency and efficacy of Az has not been modified by the incorporation of β -CD, however, reduced to DS. The DS ($IC_{50} = 9.8 \mu$ M) and Az ($IC_{50} = 9.0 \mu$ M) were equally potent in the SOL and these activities were not modified by the incorporation to β -CD. DS β -CD ($ID_{50} = 1.6$ mg/kg) and Az β -CD ($ID_{50} = 1.6$ mg/kg) were equally potent in inhibiting the twitches of the gastrocnemius and the intravenous administration increased the mean arterial blood pressure in guinea pigs. Intravenous administration of DS, AZ, DS β -CD and Az β -CD in rats increased SVP without changing DVP and significantly increased +dP/dt and -dP/dt. Oral treatment with DS and DS β -CD for 7 days significantly reduced the contraction induced by caffeine in EDL and SOL muscles submitted to denervation. This study concluded that the increase in solubility resulting from the incorporation of DS and Az in β -CD represents a significant advance in the treatment of HM and other diseases with muscle spasticity.

Keywords: dantrolene, azumolene, β -cyclodextrin, skeletal muscle, malignant hyperthermia and spasticity.

SUMÁRIO

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
LISTAS DE ILUSTRAÇÕES E DE TABELAS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 DANTROLENE SÓDICO.....	16
1.2 FISIOLOGIA MUSCULAR ESQUELÉTICA	18
1.2.1 Inervação das fibras musculares	18
1.2.2. Acoplamento excitação-contração muscular	19
1.3 RECEPTORES DE RIAODINA	22
1.4 HIPERTERMIA MALIGNA.....	23
1.4.1 Fisiopatologia da HM	24
1.4.2. Diagnóstico da HM	28
1.4.2. Tratamento da HM	29
1.5 ESPASTICIDADE.....	29
1.5.1. intervenção cirúrgica	31
1.5.2. Intervenção não medicamentosa	32
1.5.3. Intervenção medicamentosa	32
1.6. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS	34
1.6.1 Azumolene Sódico	34
1.6.2 Solubilidade comparativa entre DS e Az	35
1.6.3 Incorporação em moléculas de ciclodextrina	35
1.7 OBJETIVOS	38
1.7.1. Objetivo geral	38
1.7.2. Objetivos específicos.....	38
2 METODOLOGIA	39
2.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE DS E AZ INCORPORADOS EM β -CD ...	40
2.2 SUBSTÂNCIAS	40
2.3 ANIMAIS.....	40
2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE DS E AZ INCORPORADOS EM β -CD NO MÚSCULO ESQUELÉTICO	41
2.4.1 Experimentos <i>in vitro</i>: atividade em músculos isolados.....	41
2.4.2 Experimentos <i>in vivo</i>: atividade muscular após administração sistêmica.....	42

2.5. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	43
2.6 EXPERIMENTOS REALIZADOS EM ANIMAIS SUBMETIDOS À MODELO DE DESNERVAÇÃO.....	43
2.6.1. Procedimento cirúrgico de desnervação	43
2.6.2. Protocolo experimental.....	44
2.6.3 Efeito de DS e DS β-CD na contratura dos músculos espásticos	44
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
3 RESULTADOS.....	46
3.1 ALTERAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE DS E AZ APÓS INCORPORAÇÃO EM β - CD	47
3.2 POTÊNCIA COMPARATIVA ENTRE DS E AZ INCORPORADOS EM β -CD: AVALIAÇÃO IN VITRO.	47
3.3 EFEITO CAUSADO PELA INCORPORAÇÃO DO DS E AZ EM β -CD NOS ABALOS DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO	50
3.4 EFEITO CAUSADO PELA INCORPORAÇÃO DO DS E AZ EM β - CICLODEXTRINA NA PRESSÃO ARTERIAL.....	51
3.5 EFEITO HEMODINÂMICOS DE β -CD, DS, DS β -CD, AZ E AZ β -CD EM RATOS.....	51
3.6 EFEITO DA DESNERVAÇÃO NA POSTURA DOS CAMUNDONGOS.....	54
3.7 ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS CAUSADAS PELA DESNERVAÇÃO EM MÚSCULOS DE CAMUNDONGOS	55
3.8 RELAÇÃO ENTRE CONTRATURA INDUZIDA PELA CAFEÍNA COM O TEMPO DE DESNERVAÇÃO DOS DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE CAMUNDONGOS	56
3.9 EFEITO DE β -CD, DS E DS β -CD NA REDUÇÃO DA CONTRATURA INDUZIDA POR CAFEÍNA EM ANIMAIS DESNERVADOS.....	58
4 DISCUSSÃO	60
5 CONCLUSÃO	66
6 REFERÊNCIAS.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α CD	α -ciclodextrina
β CD	β -ciclodextrina
γ CD	γ -ciclodextrina
Ach	Acetilcolina
ADP	Ácido adenosinodifosfórico
AEC	Acoplamento excitação-contração
ATP	Ácido adenosinotriposfórico
AVE	Acidente vascular encefálico
Az	Azumolene sódico
Az β -CD	Azumolene sódico incorporado em β -ciclodextrina
CD	Ciclodextrina
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CICR	“Calcim-Induced-Calcium Release” - Liberação de cálcio induzida por cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
CPK	Creatinofosfoquinase
CSQ	Calsequestrina
DHPR	Receptor de di-idropiridina
DI ₅₀	Dose inibitória média
DICR	“Depolarization Induced Calcium Release” - Liberação de cálcio induzida por despolarização
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DS	Dantrolene sódico
DS β -CD	Dantrolene sódico incorporado em β -ciclodextrina
ECG	Eletrocardiograma
EDL	Músculo extensor longo dos dedos
EUA	Estados Unidos da América
FC	Frequência cardíaca
FKBP12	Proteína de ligação FK506
HE	Hematoxilina e Eosina
HM	Hipertermia maligna
HMN	Negativo para hipertermia maligna
HMS	Susceptível à hipertermia maligna
i.p.	Intraperitoneal

i.v.	Intravenoso
NAchR	Receptor de acetilcolina nicotínico
O ₂	Gás oxigênio
PCO ₂	Pressão de CO ₂
Pi	Fosfato inorgânico
PPM	Potencial da placa motora
PVD	Pressão ventricular diastólica
PVS	Pressão ventricular sistólica
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor de rianodina
RYR1	Gene codificante do RyR1
RyR1	Receptor de rianodina tipo 1
RyR2	Receptor de rianodina tipo 2
RyR3	Receptor de rianodina tipo 3
SERCA	Ca ²⁺ - ATPase do retículo sarcoplasmático
SERCA1	Ca ²⁺ - ATPase do retículo sarcoplasmático – isoforma 1
SERCA2a	Ca ²⁺ - ATPase do retículo sarcoplasmático – isoforma 2a
SOL	Músculo solear
TCCH	Teste de Contração à Cafeína e Halotano
v.o.	Via oral

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E DE TABELAS

Figura 1	Estrutura química do DS	16
Figura 2	Junção neuromuscular	20
Figura 3	Complexo DHPR-RyR1 no músculo esquelético.	21
Figura 4	Acoplamento excitação-contração da célula muscular estriada esquelética.	22
Figura 5	Estrutura do RyR1	23
Figura 6	Fisiopatologia da hipertermia maligna	27
Figura 7	O arco reflexo de estiramento e sua influência na fisiopatologia da espasticidade	31
Figura 8	Principais fármacos utilizados no tratamento da espasticidade..	33
Figura 9	Estrutura química do Az e modificações em relação ao DS.....	34
Figura 10	Estruturas químicas das ciclodextrinas α (a), β (b) e γ (c) com seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente.....	36
Figura 11	Esquema da associação de ciclodextrinas com um fármaco, formando os complexos fármaco-ciclodextrina.	37
Figura 12	Esquema representativo da cuba experimental usada para testes <i>in vitro</i>	41
Figura 13	Curva concentração-resposta de β -CD, DS, DS β -CD, Az e Az β -CD na tensão isométrica do músculo EDL de camundongos.	48
Figura 14	Curva concentração-resposta de β -CD, DS, DS β -CD, Az e Az β -CD na tensão isométrica do músculo SOL de camundongos.	49
Figura 15	Efeito causado pela incorporação de DS e Az em β -ciclodextrina (β -CD) nos abalos do músculo gastrocnêmio de cobaias.....	50
Figura 16	Efeito causado pela incorporação de DS e Az em β -ciclodextrina (β -CD) na pressão arterial de cobaias após injeção em bolo das substâncias nas doses de 0,5, 1, 2.5, 5, 7.5 e 10 mg/kg.	51
Figura 17	Efeito da administração em bolo de β -CD, DS, DS- β -CD, Az e Az- β -CD na PVS e na PVD de ratos	52
Figura 18	Efeito da administração em bolo de β -CD, DS, DS- β -CD, Az e Az- β -CD na FC de ratos.....	53
Figura 19	Efeito da administração em bolo de β -CD, DS, DS- β -CD, Az e Az- β -CD na + dP/dt e - dP/dt de ratos.....	54
Figura 20	Alteração na pata esquerda dos camundongos após 7 dias da secção total do nervo ciático	55
Figura 21	Efeito da desnervação na contratura induzida por cafeína dos músculos EDL de camundongos desnervados por 7, 14 e 21 dias.....	57
Figura 22	Efeito da desnervação na contratura induzida por cafeína dos músculos SOL de camundongos desnervados por 7, 14 e 21 dias.....	57
Figura 23	Curva concentração-resposta na contratura induzida por cafeína dos músculos EDL de camundongos desnervados por 7 e tratados cronicamente com 25 mg/kg/dia de cada substância em estudo.	58
Figura 24	Curva concentração-resposta na contratura induzida por cafeína dos músculos SOL de camundongos desnervados por	

	7 e tratados cronicamente com 25 mg/kg/dia de cada substância em estudo.	59
Tabela 1	Incremento da solubilidade da de DS e Az após incorporação em moléculas de β -ciclodextrina.	47
Tabela 2	Inibição da amplitude dos abalos musculares dos músculos esqueléticos EDL de camundongo na concentração de 40 μ M dos compostos relacionados e a CI50 correspondente.	49
Tabela 3	Tabela 3: Inibição da amplitude dos abalos musculares dos músculos esqueléticos SOL de camundongo na concentração de 40 μ M dos compostos relacionados e a CI50 correspondente.	49
Tabela 4	Dose necessária para inibir 50% dos abalos musculares (DI_{50}) no músculo gastrocnêmio de cobaios <i>in vivo</i>	50
Tabela 5	Características morfométricas dos músculos esqueléticos e peso corporal dos animais.	56

1 INTRODUÇÃO

1.1. DANTROLENE SÓDICO

O dantrolene sódico (DS) (1-5[[5-(p-nitrofenil)furfurilidina]amino]hidantoína sódica) (Figura 1) é um derivado da hidantoína sintetizado por SNYDER et al (1967) com propriedade relaxante muscular e introduzido na clínica em 1979 (KOLB et al, 1982). Inicialmente, o DS foi usado como relaxante para o tratamento crônico de espasmos da musculatura esquelética (KRAUSE et al, 2004) e permanece até hoje como único fármaco disponível no tratamento da mesma. Ele inibe a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o citoplasma, etapa fundamental no mecanismo de excitação-contração do músculo esquelético. Isso se dá através do bloqueio direto da ativação do receptor de rianodina do tipo 1 (RyR1) sem comprometer a ativação dos receptores de di-idropiridina (DHPR). Existe evidências que o DS mantém o RyR1 em estado fechado (BANNISTER et al, 2013) com seletividade a esta isoforma do RyR e com baixa afinidade pelas isoformas presentes nos músculos cardíaco e liso, RyR2 e RyR3, respectivamente (YU et al, 2000; ZHAO et al, 2001, KOBAYASHI et al, 2009).

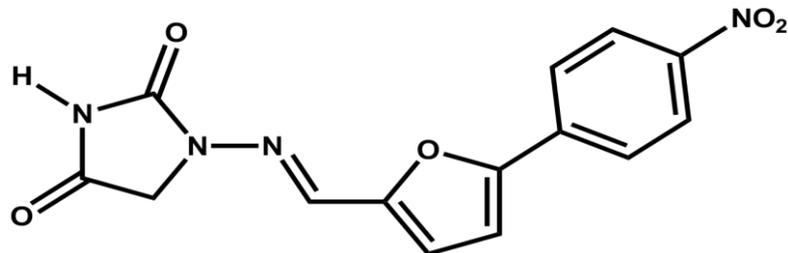


Figura 1. Estrutura química do dantrolene. Adaptado de TONIN, 2012.

Atualmente o principal uso do DS é para o tratamento da hipertemia maligna (HM) e, desde sua introdução clínica a mortalidade da crise de HM reduziu de 75 para menos de 10 % dos casos (KIM, 2012). DS também é utilizado no tratamento de outras intercorrências médicas, como a síndrome neuroléptica maligna (MARELLI et al, 1996), intoxicação por ecstasy (WEBB; WILLIAMS, 1993) e, principalmente, no auxílio ao tratamento de espasticidade (CHOU; PETERSON; HELFAND, 2004, KHEDER; NAIR, 2012). Nesses casos, além do efeito relaxante muscular, observa-se redução da hiperreflexia dos movimentos involuntários e do clônus muscular.

Estudos recentes avaliam o papel dos receptores de rianodina (RyR) e sua regulação na alta liberação de Ca^{2+} observada em neurônios, podendo ser um fator patogênico para o início da doença de Alzheimer (GOUSSAKOV; MILLER; STUTZMANN, 2010). Sendo assim, diversos estudos vêm utilizando o DS, por sua ação antagonista nos RyRs, e observando redução na deficiência de memória, aprendizado e alterações histológicas em modelos animais da doença (POPUGAEVA; BEZPROZVANNY, 2013).

Relativa a farmacocinética do DS, a absorção do DS após administração oral é de 70%, o tempo para atingir o pico plasmático de 4 a 6 horas e meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) em de 10 a 13 horas em adultos (FLEWELLEN et al, 1993). DS é metabolizado pelos microsossomos hepáticos, através das vias de oxidação e de redução, em metabólitos menores e menos ativos, principalmente em 5-hidroxi-dantrolene, que também tem efeito relaxante muscular, porém com metade da potência do fármaco original (KRAUSE et al, 2004). A eliminação do DS e dos metabólitos se dá através da urina e bile (DYKES, 1975).

Embora eficaz para o tratamento da HM, para a dissolução do DS são necessários pessoas treinadas e tempo. Ainda assim, como a solubilidade de DS é baixa (0,3 mg/ml) é necessário injetar grandes volumes, o que pode causar hipervolemia.

O DS apresenta-se como um fármaco seguro e com mínimos efeitos colaterais quando utilizado em doses adequadas em humanos (KRAUSE et al, 2004, KIM et al, 2011). Os principais efeitos adversos que podem ocorrer com a administração de dose única excessiva ou crônica por uso prolongado consistem na fraqueza muscular, euforia, tonturas e sonolência (KRAUSE et al, 2004). A hepatotoxicidade atribuída ao DS atinge aproximadamente 1% dos pacientes submetidos ao tratamento pela via oral (KRAUSE et al, 2004) e não há relatos de insuficiência renal. Assim como a hepatotoxicidade, a debilidade muscular, flebite e falha respiratória foram os achados mais consistentes com tratamentos crônicos e/ou doses elevadas (BRANDOM; LARACH, 2002, KRAUSE et al, 2004, KIM et al, 2011).

Sendo DS um relaxante muscular (SNYDER et al, 1967) com ação principal no RyR1 (BANNISTER et al, 2014), faz-se necessário compreender o mecanismo da contração muscular e o papel dos RyRs nesse processo.

1.2 FISILOGIA MUSCULAR ESQUELÉTICA

O tecido muscular representa 40 a 50% do peso corporal total, compreendendo um dos tecidos com maior dinâmica e plasticidade do organismo humano (FRONTERA; OCHALA, 2014). Possui as principais funções de geração de força e poder de contração, ser um tecido de estoque de substratos como aminoácidos e carboidratos e geração de calor para a manutenção da temperatura corporal (WOLFE, 2006). Com isso, os músculos esqueléticos se mostram importantes e relevantes na prevenção de doenças e manutenção do estado saudável. Doenças musculares, genericamente denominadas miopatias, são aquelas que cursam com deficiência funcional, morfológica (menor massa muscular) ou metabólica das fibras musculares, e impedem o organismo de responder corretamente às situações de estresse e injúrias crônicas. Toda a atividade do músculo esquelético é regulada pela concentração intracelular de Ca^{2+} . Falha nesta regulação resulta em alterações severas na contração e metabolismo muscular.

O músculo esquelético é composto por fibras musculares delgadas (10 a 80 μm de diâmetro) e longas (1 a 25 cm comprimento) que contém feixes de filamentos grosso e finos, correspondentes às moléculas de miosina e actina, respectivamente, por toda sua extensão, chamados miofibrilas. São esses filamentos que irão deslizar uns sobre os outros promovendo o encurtamento dos sarcômeros (menores unidades contráteis), ou seja, a contração muscular

1.2.1 Inervação das fibras musculares

O neurônio motor que inerva as fibras musculares produz as principais mudanças dessas células, como a formação da placa motora e principalmente o tipo de contração que o músculo adotará. Seu corpo celular está localizado no corno anterior da medula e ao se aproximar do músculo a fibra nervosa motora se ramifica e cada ramificação inerva uma fibra muscular. O conjunto formado pela fibra motora suas ramificações e a fibras musculares inervada constitui uma unidade motora. As fibras do tipo I (fibras lentas, com metabolismo principalmente oxidativo) são inervadas por neurônios com um corpo celular menor e recebem impulsos nervosos em maior quantidade mas de baixa frequência, enquanto as fibras do tipo II (rápidas,

com metabolismo basicamente glicolítico) são inervadas por um neurônio motor maior e recebem impulsos de alta frequência.

Músculos desnervados apresentam fasciculações, contrações pequenas e irregulares e, após um tempo, fibrilações, contrações espontâneas e contínuas. Isso se deve ao espalhamento dos receptores nicotínicos por todo o sarcolema e não só na placa motora, fazendo as fibras ficarem hipersensíveis à Ach. Outro processo que ocorre após a desnervação é a atrofia muscular, ou seja, redução da massa muscular e conseqüente fraqueza desse músculo (SCHIAFFINO et al, 2013). A reinervação restaura as condições normais da fibra muscular. Alguns estudos indicaram que se uma fibra anteriormente rápida for reinervada com um neurônio pequeno, e que liberará fatores tróficos para o desenvolvimento de uma fibra lenta, a fibra rápida pode se diferenciar em fibra lenta, e vice-versa (BULLER; ECCLES; ECCLES, 1960). Dessa forma, observa-se como a inervação é crítica para o fenótipo do tipo muscular e sua correta funcionalidade.

1.2.2. Acoplamento excitação-contração muscular

O sarcolema é a membrana citoplasmática das fibras e possui diversas invaginações, os chamados túbulos transversos (túbulos T), que permeiam todas as miofibrilas, o que é de extrema importância para a condução uniforme do potencial de ação proveniente do neurônio motor que inerva cada uma das fibras muscular.

Um potencial de ação inicial se propaga e despolariza o neurônio motor atingindo os botões sinápticos da junção neuromuscular (Figura 2), nome dado à junção do neurônio motor com uma porção diferenciada da fibra muscular, chamada de placa motora. Tal despolarização neuronal abre os canais de Ca^{2+} , etapa importante para que ocorram mobilização e fusão da membrana vesicular contendo o neurotransmissor acetilcolina (ACh) com a membrana plasmática da terminação nervosa e liberação do seu conteúdo para a fenda sináptica (NAGUIB et al, 2002). A ACh por sua vez, se liga aos receptores nicotínicos pós-sinápticos (NACHR) na placa motora, e apenas nesse local. No sarcolema, há indução de um aumento acentuado e imediato da permeabilidade dos cátions Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . O processo de abertura do canal é a base do potencial de placa motora (PPM) que desencadeia o potencial de ação na região vizinha eletroexcitável do sarcolema. Caso sua amplitude seja suficiente para atingir o limiar de excitação, é desencadeado um

potencial de ação que se propaga para o restante da fibra, através dos túbulos T. Este processo envolvendo a excitação do sarcolema e a transdução deste sinal para organelas intracelulares envolvidos com a contração muscular é definido como o acoplamento excitação-contração (AEC) muscular.

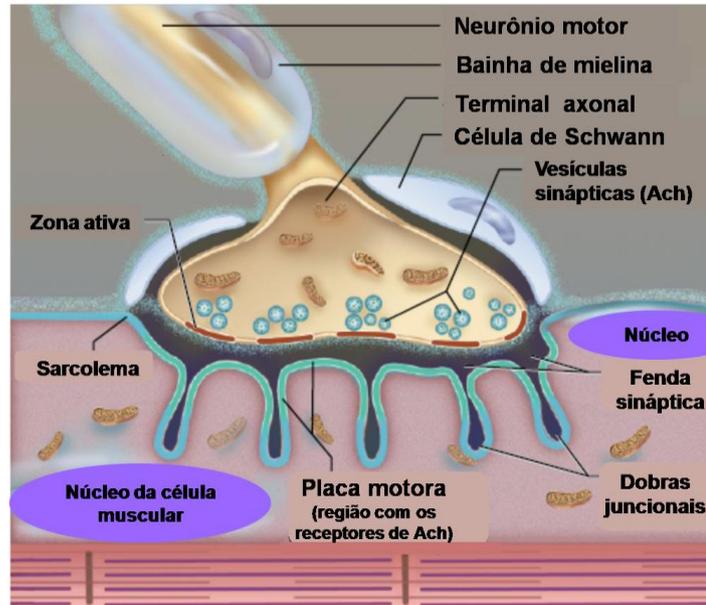


Figura 2. Junção neuromuscular. Adaptado de WIDMAIER; RAFF; STRANG (2008).

Nos túbulos T encontram-se localizados os canais ou receptores de Ca^{2+} sensíveis as di-hidropiridinas (DHPRs – canais de Ca^{2+} do tipo L – $\text{Ca}_v1.1$) e em contato íntimo com essas invaginações, está o retículo sarcoplasmático (RS), responsável pelo armazenamento, liberação e recaptção do Ca^{2+} . Conseqüentemente, os DHPR ficam mecanicamente acoplados aos canais liberadores de Ca^{2+} (RyR1) (Figura 3), etapa fundamental para a ativação da contração muscular. Esse acoplamento é bi-direcional: os DHPRs, sensibilizados pela despolarização do sarcolema, ativam por um acoplamento mecânico os RyR1, e estes afetam a probabilidade de abertura dos DHPRs. De forma altamente organizada, o complexo DHPR-RyR1 se encontra na proporção de 4 $\text{Ca}_v1.1$ (tétrade) acoplados a um RyR1 (FILL; COPELLO, 2002).

Essa liberação de Ca^{2+} pelo RyR1 no músculo esquelético é conhecida como DICR (“Depolarization Induced Calcium Release”), que significa liberação de Ca^{2+} induzida por despolarização (MURAYAMA; KUREBAYASHI, 2010). Já em outro tipo muscular estriado, o músculo cardíaco, os túbulos T são mais distribuídos e não há

um acoplamento direto entre os DHPRs e o receptor de rianodina cardíaco, isoforma do tipo 2 (RyR2), sendo necessário um platô de despolarização para gerar um influxo de Ca^{2+} através do DHPR, permitindo assim a liberação de Ca^{2+} do RS pelo RyR2. Esse processo é conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR, “Calcim-Induced-Calcium Release”) (PAUL-PLETZER et al, 2002).

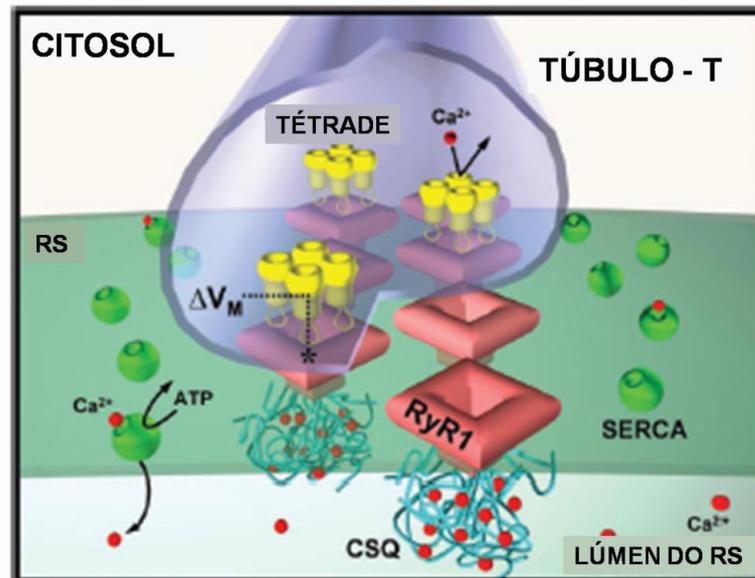


Figura 3. Complexo DHPR-RyR1 no músculo esquelético. Cada RyR1 está associado com uma tétrade (4 unidades) de DHPRs. Uma diferença na voltagem da membrana (ΔV_M) ativa os DHPRs, possibilitando o influxo de Ca^{2+} para o sarcolema. Essa entrada não é de extrema importância para a ativação dos RyR1 no músculo esquelético, e sim a transmissão por um contato direto e físico entre DHPR e RyR1. Isso se deve à uma região específica na estrutura do DHPR na região citosólica desse canal. Após isso, o RyR1 se abre e libera o Ca^{2+} armazenado no interior do retículo sarcoplasmático (RS). A calsequestrina (CSQ) é encontrada no lúmen do RS e próximo aos RyR1. A SERCA, uma Ca^{2+} -ATPase do RS, utiliza a energia do ATP para realizar a recaptação do Ca^{2+} de volta para o interior do RS. Adaptado de FILL; COPELLO (2002).

Em seguida, o Ca^{2+} se liga a troponina C e desta ligação resulta o processo de interação/deslizamento da actina com a miosina levando à contração da fibra muscular. Para essa contração cessar, é necessário que o Ca^{2+} se desligue da troponina C e uma vez livre, este íon deve ser recaptado para o RS. Este processo é realizado pela proteína Ca^{2+} -ATPase, também conhecida como SERCA1, presente na membrana do RS de células musculares esqueléticas (Figura 4).

Em situações de repouso, a concentração de Ca^{2+} no RS é 10.000 vezes maior do que no citoplasma (MICKELSON; LOUIS, 1996).

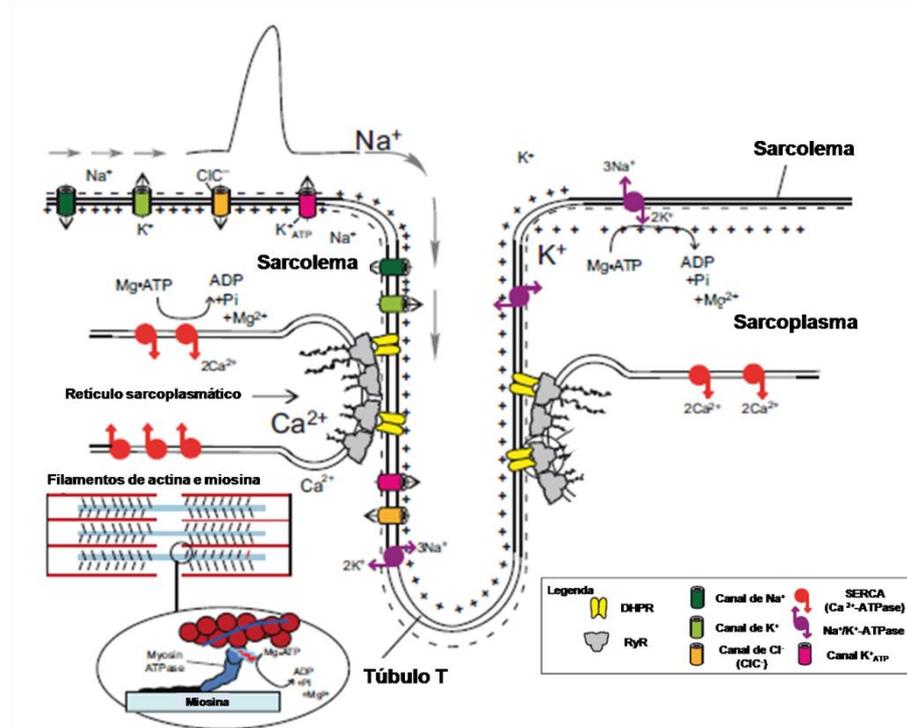


Figura 4. Acoplamento excitação-contrção da célula muscular estriada esquelética. Adaptado de MacINTOSH et al, 2014).

1.3 RECEPTORES DE RIANODINA

Como dito anteriormente, o RyR é o canal iônico localizado na membrana do RS que permite o efluxo do Ca^{2+} desta organela para o sarcoplasma (MACKRILL, 2010). Esses canais estão presentes em todos os tipos celulares, e estão envolvidos em diversos processos celulares como o acoplamento excitação-contrção, neurotransmissão e secreção (FILL; COPELLO, 2002). Em mamíferos, já foram caracterizados três isoformas: RyR1 é encontrado predominantemente no músculo esquelético e também nos linfócitos B; RyR2 é encontrado no músculo cardíaco e RyR3 é pouco expresso em muitos tecidos, mas níveis maiores são encontrados no diafragma e nas células neuronais (FILL; COPELLO, 2002; BALSHAW; YAMAGUCHI; MEISSNER, 2002).

Sua estrutura molecular consiste em um homotetrâmero com massa molecular de aproximadamente 560 kDa, apresentando a forma de um sino (PHILLIPS et al, 1996; KOVACS, 2010) (Figura 5). Apresenta um grande domínio citosólico, que contém sítios de ligação para outras proteínas e canais moduladores

da atividade desse canal (MARKS, 2002), e um domínio menor inserido na membrana do RS compreendendo a região C-terminal da proteína com 4 domínios transmembranares.

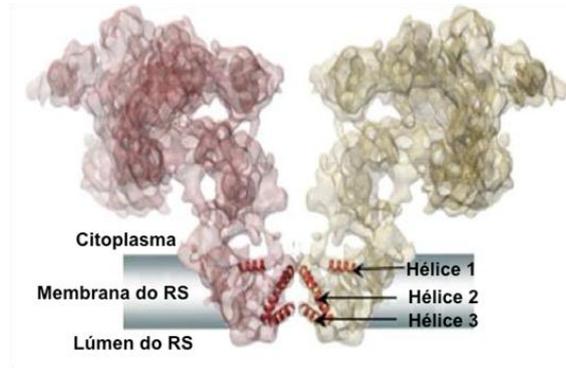


Figura 5. Estrutura do RyR1 (HAMILTON et al, 2009).

Além do íntimo contato do RyR1 com os canais DHPRs, cada uma das 4 subunidades do RyR está estreitamente associada com uma proteína chamada de FKBP12 que regula a probabilidade e o tempo médio de abertura do canal (SAMSÒ; WAGENKNECHT; ALLEN, 2005).

Alterações na estrutura dos RyRs podem desregular a concentração intracelular de Ca^{2+} , importante para a correta funcionalidade muscular. Em um indivíduo susceptível à HM (HMS), há liberação exacerbada de Ca^{2+} , o que aumenta a sua concentração a um nível muito acima do fisiológico.

1.4 HIPERTERMIA MALIGNA

A HM é uma síndrome farmacogenética do músculo esquelético caracterizada por resposta hipermetabólica aos anestésicos inalatórios halogenados e à succinilcolina (DENBOROUGH, 1998). Essa síndrome foi descrita pela primeira vez em 1960 por Denborough e Lovell após um jovem australiano de 21 anos anestesiado com halotano, apresentar quadro de taquicardia, sudorese e rigidez muscular. Apesar da gravidade do quadro clínico, o paciente sobreviveu (DENBOROUGH;LOVELL, 1960). Posteriormente revelou-se que dez de seus parentes próximos haviam morrido de forma inesperada durante anestesia geral e com episódios similares. Com isso, foi proposto um caráter hereditário da HM (DENBOUROUGH et al, 1962) e, assim foi classificada dentro das doenças farmacogenéticas (DENBOROUGH et al, 1998). No final dos anos 60, o histórico

pregresso de uma família de 450 membros em Wisconsin, nos Estados Unidos da América (EUA), revelou episódios de HM em 22 indivíduos, sendo sete deles fatais. Após a descrição dessa e de outras famílias foi sugerido um padrão de penetrância dominante e autossômica (BRITT; LOCHER; KALOW, 1969).

A mortalidade da HM é maior do que 70% dos casos não tratados adequadamente (PAUL-PLETZER et al, 2002). Dados estatísticos revelam que a incidência da HM é de 1 em 3.000-50.000 crianças anestesiadas e, aproximadamente 1 em 10.000-500.000 adultos anestesiados (ROSENBERG et al, 2013). Porém, essa prevalência varia entre os países e depende da rotina anestésica utilizada em cada local. A HM afeta todos os grupos raciais e ambos os sexos, ainda que as crises tenham maior incidência nos homens (LITTLEFORD et al, 1991) e em crianças (ROSENBERG; FLETCHER, 1994).

1.4.1 Fisiopatologia da HM

A fisiopatologia da HM está diretamente relacionada com mutações, principalmente, no RyR1, responsável por cerca de 80% dos casos (ROSENBERG et al, 2013). Essas mutações o tornam muito mais permeável ao Ca^{2+} .

O aumento da concentração de Ca^{2+} mioplasmático no indivíduo HMS resulta numa contração muscular contínua e estimula as respostas metabólicas causadoras do consumo de O_2 e produção de CO_2 . Esse aumento também ativa a fosfolipase A2, resultando na lise da membrana plasmática da célula muscular, com o extravasamento de CPK, mioglobina, Ca^{2+} e K^+ para o meio extracelular. O aumento de Ca^{2+} ativa o mecanismo de coagulação provocando hemorragias por consumo de fatores de coagulação (coagulação intravascular disseminada), o que é amplamente descrito em casos terminais da crise de HM. A hiperpotassemia é a principal causa de morte da HM em função da despolarização de células cardíacas resultando em arritmias e fibrilação ventricular, sendo a medida terapêutica mais importante na redução da mortalidade pela HM.

A produção de calor durante as crises de HM é um fator importante da fisiopatologia dessa doença. Como já dito anteriormente, o músculo esquelético em repouso vem a ser o principal responsável pela produção basal de calor, principalmente pelo tônus muscular, pelo consumo de ATP das bombas iônicas e pela mobilização de cálcio nas fibras musculares com intensa participação da

proteína SERCA convertendo ATP em ADP + Pi + energia. Cerca de 50 % dessa energia é convertida em calor.

Durante as crises de HM, há uma perda da regulação metabólica, com aumento de 5 vezes no consumo de O₂ e produção de CO₂ (NELSON, 1990) e de 15 vezes nos níveis de lactato no sangue, além do aumento na temperatura corporal (aumento de 1 °C a cada 5 minutos, podendo chegar à 44 ° C - BRITT; KALOW, 1970). Isso tudo ocorre pelo aumento da concentração de cálcio mioplasmático liberado pelo RyR1 constantemente aberto, demandando uma intensa ativação da SERCA, responsável pela recaptção de cálcio, com alto gasto de ATP e de forma incompleta. Para atender as crescentes demandas de ATP necessário para esse trabalho, há uma intensa síntese do mesmo, principalmente pelo metabolismo aeróbico na mitocôndria. A energia gerada por esse processo hipermetabólico é liberada em forma de calor (FREIERMUTH et al, 2013).

Estudos recentes relatam crises de HM também em situações de estresse, como atividades físicas desgastantes, e calor extremo (WAPPLER, 2001; HIRSHEY DIRKSEN et al, 2011), apesar de ser raro. A relação entre os fatores genéticos e os ambientais ainda não estão elucidados. Dois casos de morte súbita associados com sinais de hipertermia e febre não tendo drogas como agentes causais foram reveladas em duas famílias (GROOM *et al*, 2011). Ainda assim, a forma mais grave de indução da HM é quando existe a associação de um agente halogenado com a administração intravenosa de succinilcolina.

Os agentes inalatórios halogenados, como halotano, isoflurano, enflurano e sevoflurano, são usados na clínica como anestésicos gerais, porém estudos *in vitro* realizados em animais portadores de HM, demonstram que essas substâncias potencializam a contratilidade do músculo esquelético (NELSON; DENBOROUGH, 1977). Esses agentes são moléculas lipofílicas e passam facilmente por membranas celulares. Dentro da célula aumentam a probabilidade de abertura do RyR1 o que resulta no aumento da concentração de Ca²⁺ mioplasmático (Figura 6).

A succinilcolina age nos receptores nicotínicos pós-sinápticos provocando paralisia muscular pela despolarização mantida da membrana do sarcolema. Esta despolarização induzida pela succinilcolina também abre os canais DHPR caracterizando uma ação indireta no RyR1.

As crises de HM se manifestam diferentemente nos pacientes, em relação à diversidade e gravidade dos sintomas. Além disso, a crise de HM pode iniciar alguns

minutos após a indução da anestesia ou no pós-operatório, e também não se manifestar no primeiro contato do paciente com os anestésicos.

As manifestações clínicas e laboratoriais das crises, iniciais ou tardias, incluem taquicardia, aumento da PCO_2 no gás expirado, rigidez muscular generalizada, cianose, arritmias, hipertermia, sudorese, acidose metabólica e respiratória, elevação da creatino fosfocinase (CPK) devido à lesão muscular, mioglobínúria e distúrbios da coagulação sanguínea. O quadro pode evoluir para edema pulmonar, insuficiência renal, coagulação intravascular disseminada, convulsões e conseqüentemente óbito (ROSENBERG et al, 2007). Alguns pacientes não tratados adequadamente e que não vão à óbito, podem apresentar sequelas neurológicas e renais (NELSON, 2002);

É relevante a informação de que o sintoma de hipertermia nem sempre é a manifestação inicial ou proeminente da HM, ela ocorre em apenas um terço dos casos registrados. A rigidez muscular também ocorre em apenas 25% dos casos (NELSON, 2002).

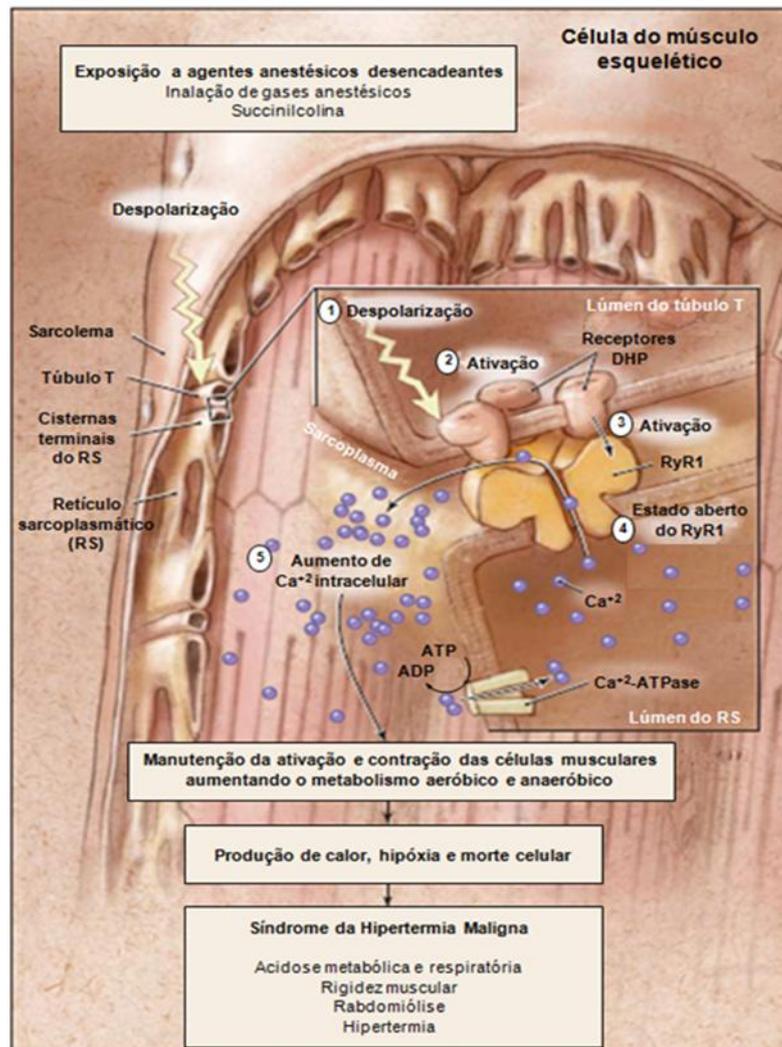


Figura 6. Fisiopatologia da hipertermia maligna. 1- Despolarização se propagando para interior da fibra muscular via túbulos T; 2- Ativação dos receptores de di-idropiridina; 3- Ativação dos RYRs1 através dos DHPs; 4- Canal de rianodina no estado aberto permitindo liberação de Ca^{2+} ; 5- aumentos dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Adaptada de LITMAN; ROSENBERG(2009).

Mais de 200 mutações já foram descritos na região codificante do RyR1 (ROSENBERG et al, 2013), o que explica os diferentes graus de manifestações clínicas da HM. No RyR1, essas mutações estão normalmente localizadas em três diferentes regiões da proteína denominadas de hot-spots (NELSON, 2002).

Mutações em outros genes tem sua relação com a HM questionadas ou são bem raras (CHAMLEY, 2000). Apenas o gene CACNA1S, que codifica o DHPR, já foi associado também à susceptibilidade à HM, sendo responsável por apenas 1% dos casos positivos (STEWART et al, 2001) e com 3 mutações já identificadas (WEISS et al 2004, PIRONE et al 2010, ELTIT et al 2012).

As mutações no gene do RyR1 também já foram relacionados à outras doenças como a central core disease (DIRKSEN;AVILA, 2004), a multi-minicore disease (JUNGBLUTH et al, 2002) e a síndrome de King-Denborough (DOWLING et al, 2011).

Outros animais como porcos (FUJII et al, 1991), cavalos (ALEMAN et al,2004) e cães (ROBERTS et al, 2001) foram identificados como portadores da HM, podendo a mesma ser manifestada a partir do estresse emocional, esforço físico e/ou calor excessivo (HALL et al, 1972). O modelo de estudo em suínos é amplamente utilizado para estudar a HM, apesar de apresentar alto custo, tem a vantagem de que no porco há apenas um ponto de mutação no gene RyR1 (R615C) (FUJII et al, 1991), sendo essa autossômica recessiva (JONES et al, 1972), diferentemente dos humanos e cães (NELSON, 1991). Outro modelo para estudo foi descrito recentemente consistindo em camundongos *knock-in* para HM, com as mutações Y522S (CHELU et al, 2006) e R163C (YANG et al, 2006), homozigotos no RyR1.

1.4.2 Diagnóstico da HM

O diagnóstico da HM sempre foi um desafio para os médicos devido à sintomatologia inespecífica e à rapidez das crises, mas com o tempo foram sendo desenvolvidos protocolos para o diagnóstico da doença e também um fármaco para o seu tratamento.

A susceptibilidade à HM é baseada nos antecedentes pessoais e familiares, devido ao caráter genético da doença. Além do histórico suspeito de crise parcial ou completa de HM durante procedimento cirúrgico, também se pode levar em conta a observação do aumento de creatino fosfoquinase (CPK) em exames laboratoriais. Mas para certificar essa condição, dois modelos diagnósticos foram criados para esse fim e ambos consistem em um Teste de Contração à Exposição à Cafeína e ao Halotano (TCCH), onde é observada a intensidade de contração de fragmentos do músculo vasto lateral *in vitro* em resposta a essas duas substâncias. O primeiro modelo foi desenvolvido pelo grupo de estudo da HM Europeu (THE EUROPEAN MALIGNANT HYPERTERMIA GROUP, 1984) e o segundo pelo Norte- Americano (LARACH, 1989). Esses padrões são adotados internacionalmente, tendo o protocolo norte-americano 99% de sensibilidade e 87% de especificidade (ALLEN;

LARACH; KUNSELMAN, 1998). Em ambos o material da biópsia de pacientes susceptíveis vão apresentar menor limiar de resposta e maior intensidade de contratura quando expostos à cafeína e ao halotano (LARACH, 1989).

Esse método tem como resultados a base do diagnóstico definitivo da HM, porém é muito dispendioso devido à necessidade de internação do paciente por 48 horas, dos cuidados no centro cirúrgico relacionados à contaminação com agentes desencadeantes da crise de HM, do treinamento da equipe hospitalar e do desconforto causado ao paciente pela biópsia.

No Brasil existem dois centros diagnósticos da HM, sendo um no Rio de Janeiro, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, e outro em São Paulo, na Universidade Federal do Estado de São Paulo, além de associação no Brasil, EUA e Europa que combatem e discutem sobre os aspectos científicos e as novidades a cerca da HM. Com isso, há a difusão do conhecimento sobre a HM e a disponibilidade de monitoração mais efetiva, permitindo um diagnóstico clínico precoce e o tratamento específico imediato, tornando possível a redução da mortalidade associada à HM.

1.4.3 Tratamento da HM

O tratamento da crise de HM consiste em suspender imediatamente a exposição ao agente desencadeante, correção dos sintomas, hiperventilação com oxigênio puro e, principalmente, o uso da única substância disponível no mercado para tratar a HM: o dantrolene sódico (DS). A dose inicial do DS é de 2,5 mg/kg em bolus com aumento posterior para 1 mg/kg a cada 4-8 horas por 24 - 48 horas (FLEWELLEN et al, 1993). Os pacientes necessitam permanecer em observação uma vez que 25% deles apresentam recrudescência da crise (ROSENBERG et al, 2007) devido à concentrações nanomolares de DS ativarem RyR1, ao contrário das micromolares que bloqueiam o canal (NELSON et al, 1996).

1.5. ESPASTICIDADE

O uso de DS na espasticidade foi o primeiro pela via oral (KETEL; KOLB, 1984). A espasticidade é definida como uma desordem do controle sensório-motor após lesão do neurônio motor resultando em ativação sustentada e involuntária dos

músculos (PANDYAN et al, 2005). É um sintoma comum após casos de paralisia cerebral, lesão cerebral ou medular traumática, acidente vascular cerebral (AVC) e esclerose múltipla. Pode variar desde um sintoma sem impacto funcional ao paciente, até um aumento na interferência do tônus muscular (resistência em si manter relaxado) resultando em injúrias ao paciente, como incapacidade de mobilidade, deslocamento e realização de atividades do cotidiano.

O arco reflexo de estiramento (SALKUNAM, 2003) é base do circuito neural que contribui para a espasticidade. Consiste nas fibras musculares contráteis e nos neurônios motores e sensoriais (Figura 7). O corpo celular do neurônio sensorial é localizado em um gânglio da raiz dorsal da medula espinhal. O ramo aferente desse neurônio sensorial é originado em um fuso muscular, no músculo esquelético relacionado aos seus respectivos neurônios motores e sensoriais. Esse fuso muscular é sensível à deformação física, e o estiramento do músculo promove um impulso no mesmo, que é transmitido pelo neurônio sensorial para a medula espinhal. Assim, o neurônio sensorial realiza sinapse com o neurônio motor. O corpo celular do neurônio motor encontra-se no interior do corno anterior da medula espinhal e inerva as fibras musculares contráteis. Assim, o impulso transmitido resulta em contração muscular.

Enquanto o músculo agonista contrai em resposta ao estiramento, o músculo antagonista relaxa. Esse relaxamento é devido à um neurônio inibitório, que também possui corpo celular no corno dorsal da medula espinhal.

Um desequilíbrio nos estímulos excitatórios e/ou inibitórios nesse arco reflexo e seus neurônios motores, resulta em hiperexcitabilidade dos mesmos, a base da fisiopatologia da espasticidade. Caso não seja tratada, a espasticidade causa encurtamento dos sarcômeros, e conseqüentemente dos músculos e tendões, espasmos musculares (movimentos involuntários), contratura do músculo e ativação dos músculos agonistas e antagonistas ao mesmo tempo.

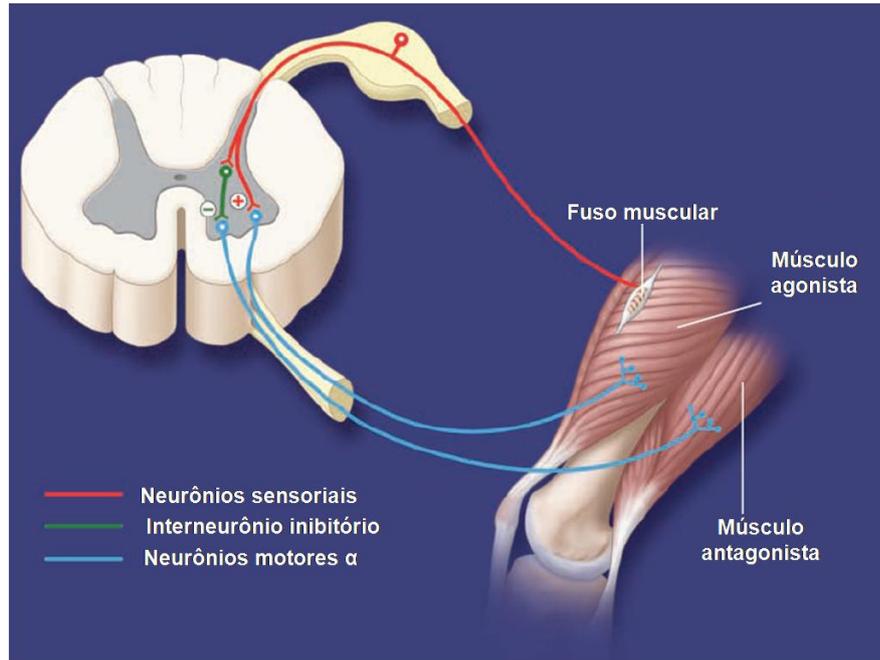


Figura 7. O arco reflexo de estiramento e sua influência na fisiopatologia da espasticidade. Adaptado de SATKUNAM, 2003.

Para avaliação clínica da espasticidade, são utilizadas escalas que quantificam diferentes aspectos da espasticidade. Porém nenhuma delas possui um padrão universal, sendo a mais utilizada a escala modificada de Ashworth quantificando o grau de tonificação e rigidez da região afetada, apesar de ter várias limitações (MUTLU; LIVANELIOGLU; GUNEL, 2008).

O tratamento visa reduzir o desconforto e dor do paciente, com melhora nas atividades habituais como se sentar, ficar em pé e andar, além de aumentar a auto-estima. Deve-se ter atenção para agravantes da espasticidade, como infecções do trato urinário e constipação. Para isso são adotadas intervenções com fármacos, tratamento funcional ou em alguns casos o procedimento cirúrgico para o tratamento da espasticidade.

1.5.1. Intervenção cirúrgica

A intervenção cirúrgica é a mais invasiva dos meios de tratamento da espasticidade. No caso da rizotomia dorsal, é realizada uma secção das ramificações do nervo dorsal proveniente da região lombosacral da medula espinhal.

Essa secção reduz o estímulo nos neurônios motores, diminuindo sua excitabilidade. A rizotomia é mais recomendada para pacientes espásticos com paralisia cerebral. É necessário um intenso programa de reabilitação e atenção para os efeitos colaterais, como incontinência urinária e dores lombares.

1.5.2. Intervenção não medicamentosa

As principais intervenções não medicamentosas para o tratamento da espasticidade incluem fisioterapia e exercícios, como alongamento, caminhada na esteira e na bicicleta (ADA et al, 2006), terapias com ultrassom, crioterapia, vibração e estimulação elétrica funcional, que modulam a elasticidade e o estímulo inibitório nos músculos (SMANIA et al, 2010); além de próteses de posicionamento correto do membro espástico.

1.5.3. Intervenção medicamentosa

A escolha de um tratamento medicamentoso para a espasticidade deve levar em conta o objetivo pretendido, para que seja escolhida a classe e o regime farmacológicos a serem utilizados adequadamente. Caso não haja resposta do paciente à um único fármaco, dois podem ser associados em conjunto, além de outras terapias não medicamentosas. (Figura 8)

Fármacos que modulam o sistema gabaérgico, como o baclofeno, a gabapentina e os benzodiazepínicos, podem ser utilizados. Os benzodiazepínicos têm uma eficácia similar aos outros fármacos, porém causam efeitos adversos mais severos. Já a gabapentina e a pregabalina são utilizadas em casos associados à dor. O baclofeno é o fármaco miorrelaxante oral mais utilizado em função de sua ação bloqueadora da liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato e aspartato). Outra forma de administração do baclofeno é pela via intratecal, com o objetivo de modular os neurônios GABAérgicos na medula espinhal, sendo indicado para pacientes com AVC, paralisia cerebral e esclerose múltipla (ZAHAVI et al, 2004).

Moduladores do sistema α -adrenérgico, como o agonista α_2 tizanidina, também são utilizados. Esse fármaco inibe os estímulos excitatórios dos interneurônios na medula espinhal e no cérebro. Outro tratamento utilizado é a

quimiodesnervação fenólica através da aplicação direta de fenol em nervos periféricos ou a administração intratecal do mesmo no volume de 0.5 a 4 ml de fenol 5%, o que causa destruição do tecido neural (GRACIES et al, 1997; PINDER et al, 2008).

Dentro dos fármacos antiespásticos mais utilizados, encontram-se também a toxina botulínica e o dantrolene. A toxina botulínica, proveniente da bactéria *Clostridium botulinum* impede o ancoramento e fusão das vesículas contendo Ach com a membrana do terminal da fibra nervosa motora dos neurônios pré-sinápticos. Isso inibe a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica, e por fim bloqueia a transmissão neuromuscular.

Já o dantrolene, diferentemente dos outros fármacos antiespásticos, age diretamente no músculo inervado, sendo menos sedativo por não ter efeitos no sistema nervoso central. A dose inicial é de 25 mg/dia oralmente na 1ª semana, com aumento progressivo com 25 mg por semana até uma dose máxima de 100 mg/dia 3 a 4 vezes. Um dos efeitos colaterais relatados pelos pacientes é a hepatotoxicidade (KRAUSE et al, 2004), portanto, a função hepática dos mesmos deve ser monitorada constantemente.

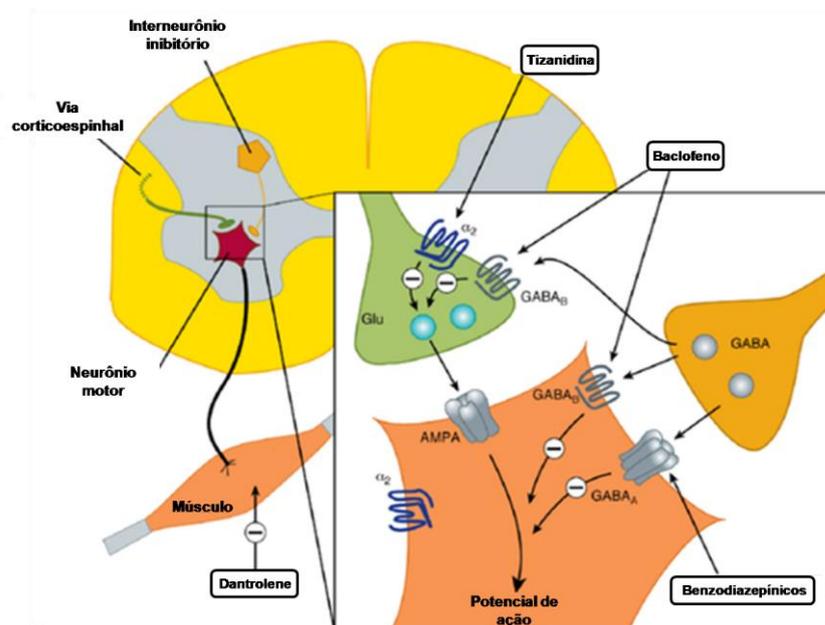


Figura 8. Principais fármacos utilizados no tratamento da espasticidade. Adaptado de <http://www.quizlet.com/30949990/pharmacology-of-muscle-relaxants-and-anti-spastic-drugs-flash-cards/>

1.6. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

1.6.1 Azumolene Sódico

Outra substância, 30 vezes mais hidrossolúvel que o DS, é o azumolene sódico (Az) (1-[[[5-(bromofenil)-2-oxazoil]-metileno]amino]hidantoína sódica) (Figura 9). Ele foi sintetizado por White et al em 1987 e possui duas alterações na estrutura química que consistem na substituição do grupamento p-nitro pelo grupamento p-bromo no anel benzeno do Az e na substituição do anel furânico pelo anel oxazólico. Essas alterações foram as responsáveis pela maior solubilidade em água de Az, em relação à DS (ALLEN et al, 1992) e pela alteração na cor alaranjada de DS, respectivamente.

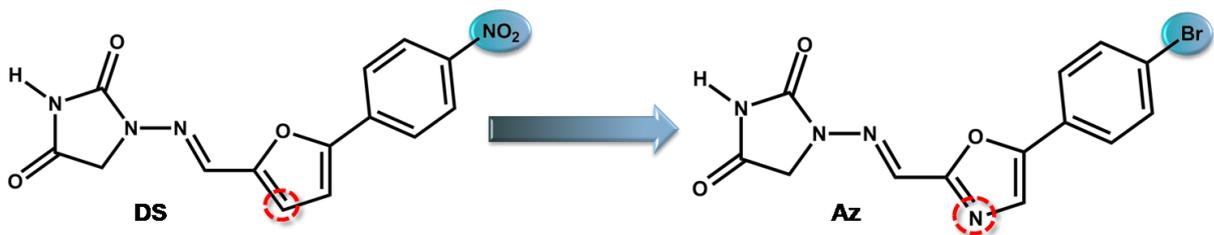


Figura 9. Estrutura química do Az e modificações em relação ao DS. Adaptado de TONIN, 2012.

Em relação ao mecanismo de ação, foi demonstrado que Az diminui a concentração intracelular de Ca^{2+} em células musculares esqueléticas de porcos HMS (ALLEN et al, 1992)., assim como DS. Entretanto, também já foi sugerido que Az atue no bloqueio da interação dos canais DHPRs com os RyRs, por inibir os DHPRs e não interagir com os RyRs de forma a levar a uma alteração na fração do canal aberto (EL-HAYEK et al, 1992).

Estudos revelaram que Az é equipotente ao DS e possui a mesma eficácia; além do efeito do Az também já ter sido comprovado em reverter a contratura induzida pela cafeína em músculo humano HMS e HMN (SUDO et al, 2008) e pelo halotano e succinilcolina em porcos geneticamente susceptíveis (ALLEN et al, 1992). Assim como DS, Az também possui baixa eficácia na redução dos abalos de

músculo cardíaco *in vitro*. Entretanto, ainda não foi aprovado para uso clínico e comercialização.

1.6.2 Solubilidade comparativa entre DS e Az

A formulação de DS para uso intravenoso utilizado na clínica é apresentada em frascos-ampola contendo nos seus frascos 20 mg da substância lipofilizada e 300 mg de manitol para facilitar a dissolução do fármaco em 60 ml de água estéril, ou seja, uma diluição de 0,33 mg/ml. Contém também hidróxido de sódio para que a solução alcance um pH de 9 a 10, caso contrário a dissolução não acontece. Ainda pode ser necessário aquecer a solução ou administrá-la com um filtro para evitar a passagem de partículas não diluídas para o sangue. Além disso, a solução deve ser protegida da luz e estocada a 15 – 25 °C, e utilizada em até 6 horas após a preparação. A solução alcalina resultante é altamente irritante às veias periféricas, devendo ser, portanto, injetada em grandes veias ou por infusão rápida (KRAUSE et al, 2004).

Essa baixa solubilidade em água promove uma grande dificuldade no preparo da solução durante a crise de HM o que pode atrasar o início da terapia.

Na dose inicial utilizada na clínica (2,5 mg/kg), são necessários 420 ml de solução a ser administrada num paciente de 70 kg, o que apresentaria um aumento substancial da volemia. A dose ainda precisa ser repetida a intervalos de 30 minutos até a normalização do estado hipermetabólico e desaparecimento de todos os sinais e sintomas da crise de HM. A dose total de DS pode atingir 10 mg/kg/dia.

Já o Az, com o incremento na sua solubilidade e possibilidade de ser dissolvido em solução isotônica, demonstra vantagem em relação ao DS. Seria possível um preparo da solução mais rapidamente e uma administração de um volume bem menor no paciente.

Ainda se fazem necessários maiores estudos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas com relação ao DS e a sua utilização na clínica, seja no desenvolvimento de novos fármacos ou de novas formulações das substâncias já existentes.

1.6.3 Incorporação em moléculas de ciclodextrina

Um grande desafio na área da formulação de medicamentos é aumentar a biodisponibilidade de compostos com uso potencial no tratamento de doenças e alterações fisiológicas. Para isso, alguns trabalhos vêm utilizando a incorporação de fármacos em moléculas de ciclodextrina (CDs)

As CDs constituem uma nova classe de excipientes farmacêuticos compostas por unidades de D-glicopirranose, que unidas originam estruturas cíclicas e cônicas. Existem diversos tipos e aquelas que possuem maior rendimento são as naturais, também divididas em α CD, β CD e γ CD, com seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (Figura 10). A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007) (Figura 11).

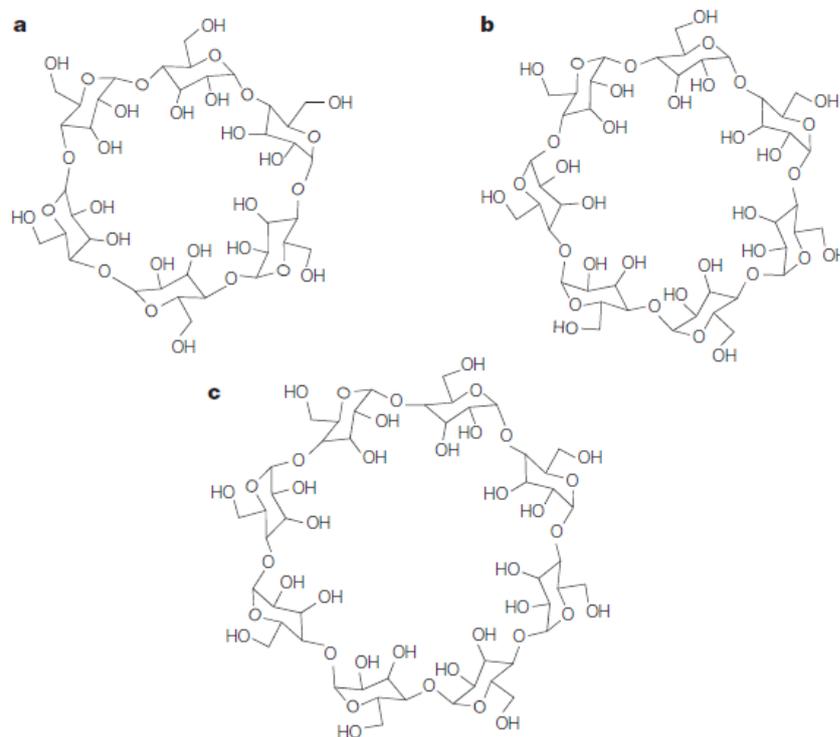


Figura 10. Estruturas químicas das ciclodextrinas α (a), β (b) e γ (c) com seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (DAVIS; BREWSTER, 2004)

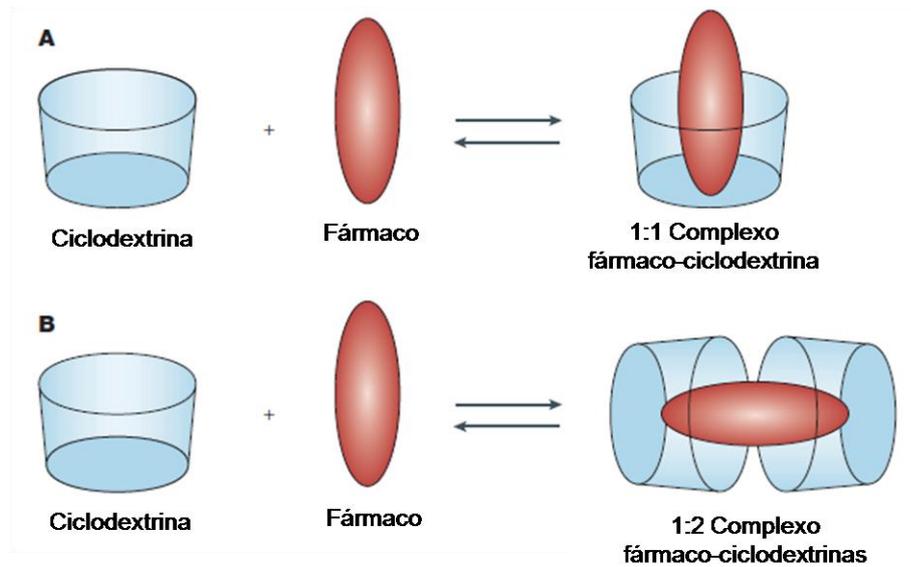


Figura 11. Esquema da associação de ciclodextrinas com um fármaco, formando os complexos fármaco-ciclodextrina. Em A, observa-se a proporção 1:1 do complexo fármaco-ciclodextrina e em B, a proporção 1:2 do complexo fármaco-ciclodextrina. Adaptado de DAVIS; BREWSTER (2004).

Na área farmacêutica, este veículo tem sido explorado principalmente no incremento da solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de medicamentos. Também se pode destacar sua utilização para mascarar odores e sabores desagradáveis de certos fármacos, para reduzir ou eliminar irritações oculares ou gastrointestinais e na prevenção de interações e incompatibilidades (LOFTSSON; BREWSTER, 1996; RAJEWSKI; STELLA, 1996; UEKAMA et al, 2004). Um grande esforço tecnológico empreendido nos últimos anos, com um forte investimento em pesquisa, possibilitou importantes reduções nos custos de produção viabilizando sua aplicação farmacêutica. Além das CDs naturais, surgiram promissores derivados semi-sintéticos com elevada capacidade de reconhecimento molecular e solubilidade aquosa.

Estudos recentes trazem a estatística de 515 associações de princípios ativos com CDs melhorando sua biodisponibilidade, estabilidade e segurança através da formação de complexos de inclusão reversíveis em água (SZEJTLI et al, 2005). Mais de 30 medicamentos comercializados no mercado mundial contam com a presença deste veículo em suas fórmulas (DAVIS; BREWSTER, 2004; LOFTSSON; DUCHENE, 2007).

1.7 OBJETIVOS

1.7.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo a avaliação farmacológica da incorporação de dantrolene e azumolene em moléculas de β -ciclodextrina na regulação da contratilidade muscular, para possível aplicação no tratamento da hipertermia maligna e de doenças espásticas.

1.7.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o aumento da solubilidade de dantrolene e azumolene sódicos incorporados em moléculas de β -ciclodextrina;
2. Investigar a eficácia e potência das incorporações em β -ciclodextrina de dantrolene e azumolene na promoção do relaxamento de músculo esquelético de camundongos através do protocolo experimental *in vitro*;
3. Avaliar a eficácia e potência das incorporações em β -ciclodextrina de dantrolene e azumolene na promoção do relaxamento de músculo gastrocnêmio de cobaias através do protocolo experimental *in vivo*;
4. Avaliar possíveis alterações hemodinâmicas provocadas pela administração intravenosa em ratos dos fármacos sódicos e incorporados em β -ciclodextrina;
5. Avaliar a resposta contrátil dos músculos esqueléticos de camundongos submetidos à secção do nervo ciático, como modelo experimental de espasticidade, e com tratamento crônico (via oral) com DS sódico e incorporado;

2 METODOLOGIA

2.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE DS E AZ INCORPORADOS EM β -CD

Protocolo de diluições seriadas e visualização da presença de partículas em suspensão por microscopia óptica foi utilizado para avaliar o incremento na solubilidade de DS e Az incorporados em moléculas de β -CD. A faixa de diluição observada foi de 50 mg/ml até 0,1 mg/ml, sendo todas as substâncias diluídas em água purificada por osmose reversa.

Os frascos com as soluções foram agitados no vórtex (modelo K45-2810, KASVI basic) em velocidade máxima durante 5 segundos a temperatura de 25° C e levados ao microscópio para análise visual. As análises foram realizadas em triplicatas para cada concentração. O limite de diluição foi definido como aquela que causava desaparecimento visual completo de partículas em suspensão.

2.2. SUBSTÂNCIAS

DS e cafeína foram adquiridos da Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA). Az, DS β -CD e Az β -CD, assim como a S(+) cetamina foram preparados e fornecidos pelo Laboratório Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (Itapira, SP, Brasil). O cloridrato de xilazina foi adquirido do Laboratório Vetbrands (SP, Brasil).

2.3. ANIMAIS

Camundongos Swiss machos (25-30 g) e ratos Wistar machos (200-250 g) obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro foram mantidos em ambiente com controle de temperatura (22-23° C), umidade (55-60%) e exaustão. Água e ração foram oferecidos sem restrição.

Cobaios machos foram obtidos de criadores privados e mantidos no biotério do Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos do Instituto de Ciências Biomédicas, com oferta de água e ração sem restrições, temperatura (22-23° C) e umidade (55-60%) e exaustão controladas.

2.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE DS E AZ INCORPORADOS EM β -CD NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob número DFBCICB012.

2.4.1. Experimentos *in vitro*: atividade em músculos isolados

Os camundongos foram trazidos para o laboratório no dia dos experimentos e sacrificados sob anestesia profunda com pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.). Após identificação e isolamento, os músculo extensor longo dos dedos (EDL) e solear (SOL) foram retirados e acomodados no interior de cubas experimentais (Figura 12) com volume interno de 20 ml, preenchidas com solução Ringer (em mM: NaCl 135; KCl 5; MgCl₂ 1; CaCl₂ 2; NaHCO₃ 15; NaHPO₄ 1; dextrose 11), mantida a pH 7,4 \pm 0,02, 37° C e continuamente oxigenada com mistura carbogênica (95 % O₂ + 5 % de CO₂).

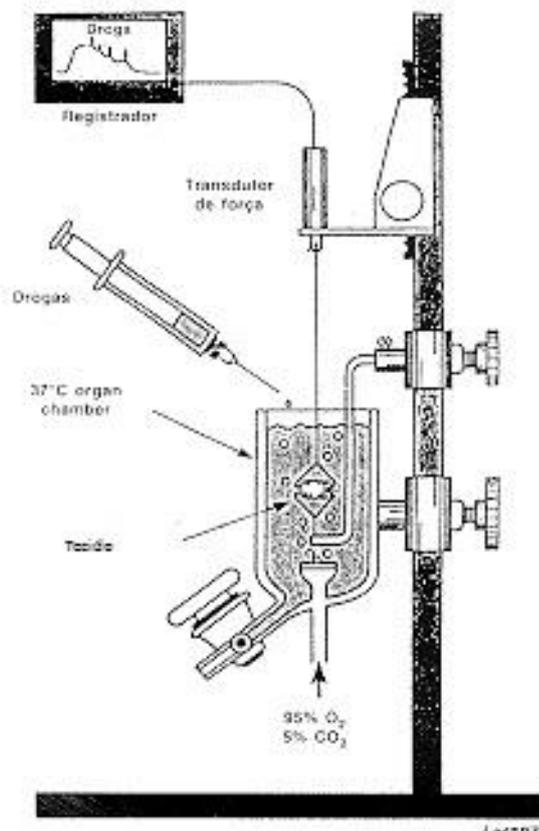


Figura 12. Esquema representativo da cuba experimental usada para testes *in vitro*.

No interior das cubas, a extremidade inferior dos músculos EDL e SOL foi amarrada a uma haste fixa e a superior fixa a transdutor de tensão isométrica (ADInstruments, MLT0201). Os sinais gerados pelos transdutor de tensão foi condicionado e digitalizado para posterior análise (Powerlab 8/35 e Quad Bridge Amp, ADInstruments) utilizando o programa Lab Chart (7.0 Version, ADInstruments, Austrália).

Os abalos musculares foram induzidos eletricamente por meio do estimulador Grass S88 (Grass AstroMed Instruments, Quincy, MA, EUA). Para obtenção dos abalos maximais foram realizadas curvas de intensidade de estimulação *versus* amplitude de abalos e estiramento *versus* amplitude de abalos antes do início dos protocolos experimentais. A frequência de estimulação foi mantida a 0,2 Hz e a duração do estímulo de 2 ms durante todos os experimentos.

Após período de estabilização dos músculos às condições experimentais, as substâncias testes β -CD pura, DS, Az, DS β -CD ou Az β -CD foi adicionada no interior da cuba experimental em concentrações crescentes (0,5, 1, 5, 10, 20, 30 e 40 μ M), a partir de uma solução estoque de 1 mM dissolvida em água purificada, a intervalos de 5 minutos ou após estabilização da amplitude dos abalos musculares.

Os abalos musculares foram armazenados em computador e os resultados analisados por meio do software Lab Chart 7.0 Version (ADInstruments, Austrália). Para efeito da análise considerou-se abalo controle, aquele medido antes da adição das substâncias à cuba.

2.4.2 Experimentos *in vivo*: atividade muscular após administração sistêmica

Cobaios machos oriundos de mercado privado e mantido no biotério do Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos do Instituto de Ciências Biomédicas pesando 300 – 400 g foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). Na traquéia foi introduzida uma cânula de polietileno conectada à bomba respiratória (Harvard mod. 611) para ventilação mecânica pulmonar. A artéria carótida e a veia jugular externa foram dissecadas. Na artéria foi inserido um cateter de polietileno, preenchido com solução salina heparizada (50 UI/ml) conectado ao transdutor de pressão MLT884 (ADInstruments, Austrália) para registro da pressão arterial (PA). Um outro cateter foi inserido na veia jugular para administração das substâncias testadas.

O nervo ciático também foi dissecado para estimulação elétrica (5 V, 1 ms de duração, 0,2 Hz de frequência) por meio de um par de eletrodos de platina acoplado ao estimulador Grass S44 (Grass AstroMed Instruments Quincy, MA, EUA). O ramo do nervo que inerva o músculo gastrocnêmio foi preservado e o tendão distal deste músculo exposto e firmemente amarrado ao transdutor de força FT03 (Grass AstroMed Instruments Quincy, MA, EUA) para registro da tensão isométrica. A PA e os abalos musculares foram digitalizados (Powerlab, ADInstruments) e os dados armazenados no computador para posterior análise utilizando o programa Lab Chart 7.0 Version (ADInstruments, Austrália). As substâncias β -CD, DS, Az, DS β -CD ou Az β -CD foram administradas i.v. nas doses de 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 e 10 mg/kg a intervalos de 10 minutos.

2.5. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

Ratos Wistar machos (200-250 g) foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.) e preparados, como descrito anteriormente (item 2.4.2.) para registro de pressão arterial por meio da introdução de cateter de polietileno heparinizado (50 UI/ml) na carótida. Este cateter foi avançado até atingir o interior do ventrículo esquerdo para medida da pressão intraventricular e de suas derivadas $\pm dP/dt$. Através de dissecação e introdução de cânula na veia jugular externa, as substâncias testadas foram administradas em dose única (2,5 mg/kg). Par de eletrodos foi fixado na região torácica (derivação DII) para registro do eletrocardiograma e frequência cardíaca. Todos os sinais foram digitalizados, armazenados no computador e analisados em equipamentos Lab Chart (ADInstruments, Austrália).

2.6. EXPERIMENTOS REALIZADOS EM ANIMAIS SUBMETIDOS À MODELO DE DESNERVAÇÃO

2.6.1. Procedimento cirúrgico de desnervação

Camundongos Swiss machos (25-30 g) foram anestesiados com S(+) cetamina (100 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilazina (5 mg/kg, i.p.). Em seguida, os mesmos foram posicionados em decúbito ventral e as patas traseiras fixadas à mesa

cirúrgica. Após tricotomia da região posterior da pata traseira esquerda e antissepsia do local, uma incisão longitudinal foi realizada no terço superior da coxa. Após afastamento da musculatura, o nervo ciático foi exposto e seccionado (2 mm de tamanho longitudinal) logo abaixo de sua emergência pelo forame isquiático maior. A pele foi suturada com fio Vicryl 4-0 e os animais foram acondicionados em gaiolas individuais e levados para o biotério de experimentação com ração e água à vontade. A pata contralateral, que não sofreu nenhum procedimento cirúrgico serviu de controle da pata desnervada.

2.6.2. Protocolo experimental

Os animais foram divididos primeiramente em três grupos de diferentes períodos de desnervação: 7, 14 e 21 dias, para avaliar se há diferença na contratatura dos músculos espásticos devido ao tempo de desnervação. Com resultados favoráveis obtidos com o menor tempo de desnervação (7 dias), foi realizada a avaliação do efeito de β -CD, DS e DS β -CD após tratamento com os mesmos durante 7 dias na dose de 25 mg/kg por gavagem, começando no dia da cirurgia. Essa dose foi fundamentada na dose de DS utilizada na clínica para o tratamento da espasticidade (KETEL; KOLB, 1984, RxList. The Internet Drug Index.).

2.6.3 Efeito de DS e DS β -CD na contratatura dos músculos espásticos

Como descrito anteriormente (Sessão Introdução), a espasticidade, devido à lesão ao neurônio motor, provoca ativação sustentada, hiperexcitabilidade e contração contínua (contratura) nos músculos inervados por esse neurônio. Sendo assim, após 7 dias da cirurgia, os animais foram sacrificados e preparados para o registro de tensão isométrica, como descrito anteriormente na sessão 2.4.1.

Os músculos dissecados e com os abalos estabilizados foram expostos a concentrações crescentes de cafeína (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 e 32 mM) por administração direta na cuba de forma cumulativa. O intervalo entre as administrações foi baseado na estabilização dos abalos e/ou da linha de base. A escolha da cafeína se deve ao fato desta substância estimular o efluxo de Ca^{2+} pelo RS por ação direta no RyR1.

As contraturas induzidas pela cafeína (aumento da tensão isométrica da linha de base) foram normalizadas em função da área de seção de cada músculo usando

a seguinte equação: peso (g)/ [comprimento (cm) x densidade do músculo (1,06)]. Então, as contraturas foram expressas em g/cm².

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. A alteração provocada pela aplicação de múltiplas concentrações ou doses foi comparada com o controle por meio do teste *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnet's. Para comparações entre múltiplos grupos experimentais foi utilizado o teste *two-way* ANOVA seguido de teste de Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados com auxílio do programa Graph Pad Prism 5.0.

As concentrações ou doses necessárias para causar 50% da inibição (CI₅₀, DI₅₀) foram expressas como média \pm EPM dos valores obtidos para cada experimento através da regressão não-linear. A comparação entre as duas médias de CI₅₀ ou DI₅₀ foi realizada por meio do test t de Student para variáveis não-pareadas.

3 RESULTADOS

3.1. ALTERAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE DS E AZ APÓS INCORPORAÇÃO EM β -CD

A Tabela 1 mostra os valores absolutos do limite de solubilidade do DS, DS β -CD, Az e Az β -CD em água e a solubilidade relativa ao protótipo DS.

Nota-se que a solubilidade do Az foi 12,1 vezes superior ao DS. A solubilidade do DS após incorporação em β -CD aumentou 6 vezes e no caso do Az este aumento foi de 2,5 vezes. A solubilidade relativa do Az β -CD em relação ao DS foi 30,3 vezes superior.

Tabela 1: Valores absolutos do limite de solubilidade do DS, DS β -CD, Az e Az β -CD em água e a solubilidade relativa ao protótipo DS.

SUBSTÂNCIA	LIMIAR DE SOLUBILIDADE (mg/ml)	SOLUBILIDADE RELATIVA AO DS
DS	0,33	1
Az	4	12,1
DS β -CD	2	6
Az β -CD	10	30,3

3.2 POTÊNCIA COMPARATIVA ENTRE DS E AZ INCORPORADOS EM β -CD: AVALIAÇÃO *IN VITRO*

As Figuras 13 e 14 mostram o efeito comparativo do DS β -CD, Az, Az β -CD e também da β -CD pura, com DS na depressão dos abalos de músculos EDL e SOL, respectivamente.

Em relação à DS no músculo EDL, pode-se notar decaimento acentuado da depressão dos abalos musculares nas concentrações inferiores a 10 μ M, após a qual se atingiu o platô da resposta depressora. O efeito máximo inibitório causado pelo DS foi de $66,9 \pm 6,1\%$ do controle, alcançado na concentração de 10 μ M. A concentração inibitória média (CI_{50}) do DS neste músculo foi de 1,6 μ M. Nota-se desvio da curva dose-resposta para a direita com o Az em relação ao DS e, assim a CI_{50} do Az foi de 7,3 μ M ($P < 0,05$). O efeito inibitório máximo da amplitude dos abalos

musculares causado pelo Az ($74,9 \pm 3,7\%$, $n= 6$) não foi diferente ao causado pelo DS (Figura 13).

A β -CD *per se* não modificou a amplitude dos abalos do EDL. Porém, reduziu a potência e a eficácia do DS nesse músculo (Figura 13). Desta forma, a redução da amplitude dos abalos musculares causada pelo DS β -CD foi de $42,6 \pm 0,4\%$ do controle ($n= 6$) na concentração de $40 \mu\text{M}$ e a CI_{50} elevou para $76,7 \mu\text{M}$ ($P<0,05$). Por outro lado, a β -CD não alterou a potência ou eficácia do Az no EDL e assim, a CI_{50} foi de $4,8 \mu\text{M}$ e a resposta inibitória máxima dos abalos musculares de $75,7 \pm 0,6\%$ ($n= 6$) (Figura 13).

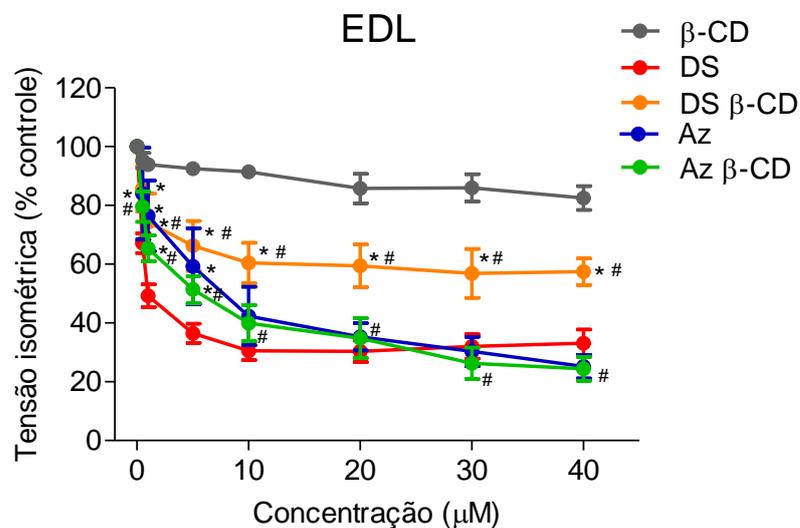


Figura 13: Curva concentração-resposta de β -CD, DS, DS β -CD, Az e Az β -CD na tensão isométrica do músculo EDL de camundongos. Os pontos representam a média \pm EPM ($n= 6$). * $P<0,05$ versus DS e # $P<0,05$ versus β -CD, na mesma concentração.

O efeito do DS na amplitude dos abalos do SOL está mostrado na Figura 14. Variações maiores da amplitude dos abalos foram obtidas entre 0-10 μM de DS e a depressão máxima foi de $61,3 \pm 6,6\%$ do controle alcançado com 40 μM de DS. A CI_{50} do DS no SOL foi de 9,8 μM . O efeito depressor do Az no SOL foi bem semelhante ao do DS e assim, a CI_{50} do Az foi de 9,0 μM e a depressão máxima de $71,6 \pm 4,3\%$ ($n= 6$).

A β -CD *per se* não modificou a amplitude dos abalos no SOL e também não alterou a potência ou eficácia do DS (Figura 14). Assim, a CI_{50} foi de 13,2 μM e a depressão máxima de $55,7 \pm 1,5\%$ ($n= 6$). A CI_{50} do Az β -CD foi aumentada para 25,8 μM ($P<0,05$) e a depressão máxima reduzida para $59,7 \pm 1,2$ ($P<0,05$).

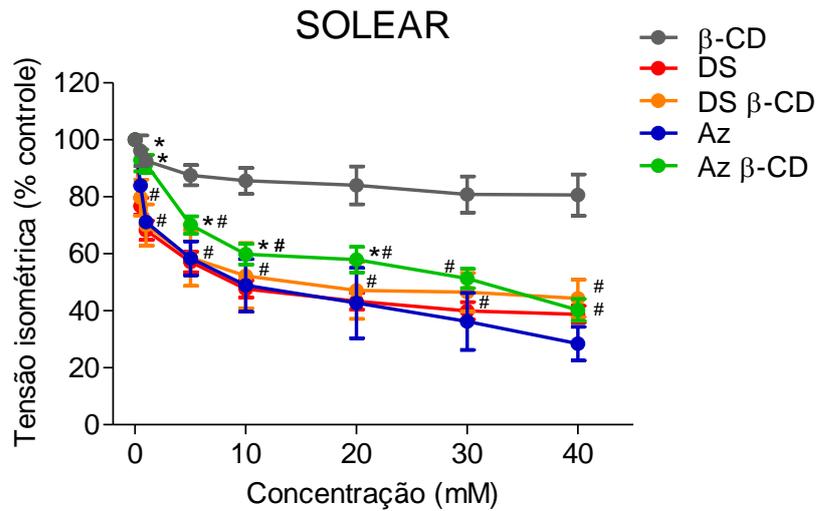


Figura 14: Curva concentração-resposta de β -CD, DS, DS β -CD, Az e Az β -CD na tensão isométrica do músculo SOL de camundongos. Os pontos representam a média \pm EPM (n= 6). *P<0,05 versus DS e #P<0,05 versus β -CD na mesma concentração.

Um sumário mostrando o efeito máximo na redução da amplitude dos abalos musculares e as CI_{50} 's das substâncias testadas está apresentado nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 2: Inibição da amplitude dos abalos musculares do EDL de camundongo na concentração de 40 μ M dos compostos relacionados e suas respectivas CI_{50} 's. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n= 6). *P<0,05 versus DS.

Músculo	Substâncias	Inibição dos abalos musculares (% controle)	CI_{50} (μ M)
EDL	DS	66,9 \pm 6,1	1,6
	DS β -CD	42,6 \pm 0,4*	76,7*
	Az	74,9 \pm 3,7	7,3*
	Az β -CD	75,7 \pm 0,6	4,8*

Tabela 3: Inibição da amplitude dos abalos musculares do SOL de camundongo na concentração de 40 μ M dos compostos relacionados e suas respectivas CI_{50} 's. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n= 6). *P<0,05 versus DS.

Músculo	Substâncias	Inibição dos abalos musculares (% controle)	CI_{50} (μ M)
SOL	DS	61,3 \pm 6,6	9,8
	DS β -CD	55,7 \pm 1,5	13,2
	Az	71,6 \pm 4,3	9,0
	Az β -CD	59,7 \pm 1,2	25,8*

3.3 EFEITO CAUSADO PELA INCORPORAÇÃO DO DS E AZ EM β -CD NOS ABALOS DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO

Para confirmar os resultados alcançados *in vitro* foi investigado o efeito de Az e DS incorporados em β -CD na contratilidade do músculo gastrocnêmio em cobaios anestesiados. A Figura 15 mostra que a administração intravenosa de doses crescentes das substâncias reduziu a amplitude dos abalos musculares de forma dose-dependente. O efeito máximo de DS β -CD foi redução de 81,1% da amplitude de abalo do controle (n= 6) visto na dose de 10 mg/kg e a de azumolene β -CD foi de 81,8% na mesma dose. A DI_{50} de ambas as substâncias, apresentada na Tabela 4 foi de $1,6 \pm 0,4$ mg/kg e $1,6 \pm 0,5$ mg/kg para DS e Az incorporados em β -CD, respectivamente, sem diferença significativa em elas. Assim, conforme observado nos experimentos *in vitro*, o efeito depressor tanto do DS quanto do Az incorporados é muito intenso.

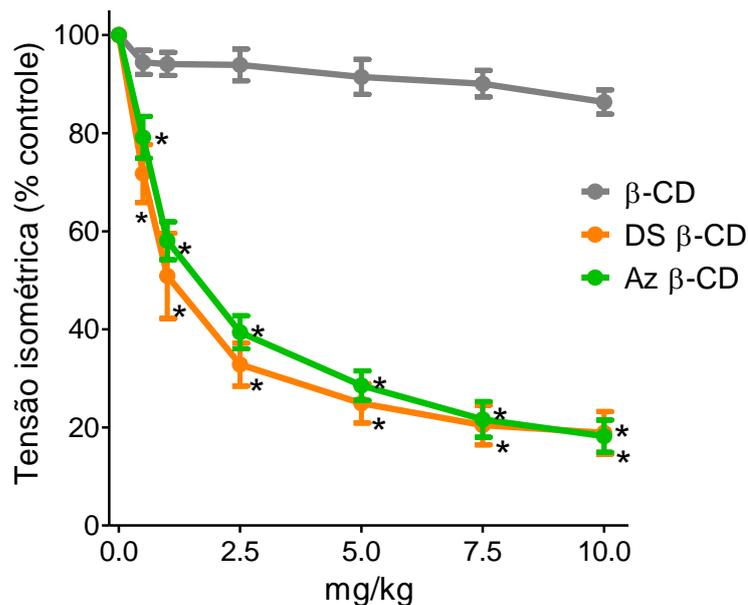


Figura 15. Efeito causado pela incorporação de DS e Az em β -CD nos abalos do músculo gastrocnêmio de cobaios. Os pontos representam a média \pm EPM (n= 6). * $P < 0,05$ versus β -CD.

Tabela 4: Dose necessária para inibir 50% dos abalos musculares (DI_{50}) no músculo gastrocnêmio de cobaios *in vivo*. A DI_{50} foi determinada para cada experimento e os dados da tabela representam média \pm EPM (n = 6).

Músculo	Substâncias	DI_{50} (mg/kg)
Gastrocnêmio	DS β -CD	$1,6 \pm 0,4$
	Az β -CD	$1,6 \pm 0,5$

3.4 EFEITO CAUSADO PELA INCORPORAÇÃO DO DS E AZ EM β -CICLODEXTRINA NA PRESSÃO ARTERIAL DE COBAIOS

Na Figura 16 é possível observar que as substâncias DS e Az incorporadas em β -CD aumentaram a pressão arterial média (PAM) dos cobaios. O DS aumentou a PAM de forma dose-dependente, enquanto que o efeito do Az se estabilizou na dose de 1 mg/kg. A PAM após injeção de DS β -CD aumentou de $42,3 \pm 3,0$ para $71,6 \pm 7,9$ mmHg (n= 6) na dose de 2,5 mg/kg e após a injeção de Az β -CD de $53,2 \pm 4,7$ para $77,8 \pm 5,3$ mmHg (n= 6) na mesma dose.

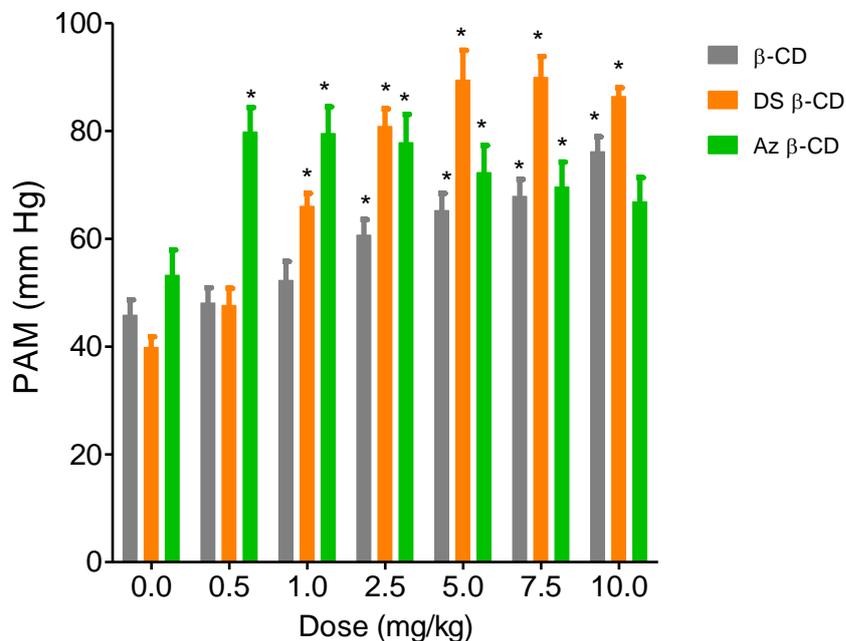


Figura 16. Efeito causado pela incorporação de DS e Az em β -CD na pressão arterial média de cobaios após injeção em bolo das substâncias nas doses de 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 e 10 mg/kg. Os resultados representam a média \pm EPM (n= 6). * $P < 0,05$ versus controle.

3.5 EFEITOS HEMODINÂMICOS CAUSADOS PELA β -CD, DS, DS β -CD, AZ E AZ β -CD EM RATOS

Para avaliar as alterações hemodinâmicas causadas pela administração em bolo de β -CD, DS, DS β -CD, Az E Az β -CD na dose 2,5 mg/kg em ratos, foram registradas a pressão ventricular sistólica (PVS), pressão ventricular diastólica (PVD), +dP/dt máxima e -dP/dt máxima. A frequência cardíaca (FC) foi computada a partir do registro do eletrocardiograma.

A PVS quando comparada ao controle foi aumentada ($P < 0,05$) pela administração de DS ($57,0 \pm 2,4$ para $81,1 \pm 3,6$ mmHg), DS- β -CD ($55,6 \pm 1,9$ para $82,6 \pm 3,9$ mmHg), Az ($64,4 \pm 4,1$ para $105,2 \pm 5,2$ mmHg) e Az- β -CD ($48,6 \pm 4,5$ para $88,3 \pm 7,0$ mmHg) (Figura 17A). A PVS não foi modificada pela β -CD ($58,2 \pm 4,0$ para $67,3 \pm 4,5$ mmHg). A PVD (Figura 17B) não foi modificada pela administração de qualquer uma das substâncias (β -CD, $7,5 \pm 0,8$ para $8,8 \pm 0,6$ mmHg; DS, $9,5 \pm 1,0$ para $9,4 \pm 1,1$ mmHg; DS- β -CD, $8,6 \pm 0,2$ para $9,8 \pm 0,5$ mmHg; Az, $7,7 \pm 0,9$ para $8,7 \pm 1,4$ mmHg e Az- β -CD, $5,3 \pm 0,9$ para $7,2 \pm 1,0$ mmHg) (Figura 17 A e B).

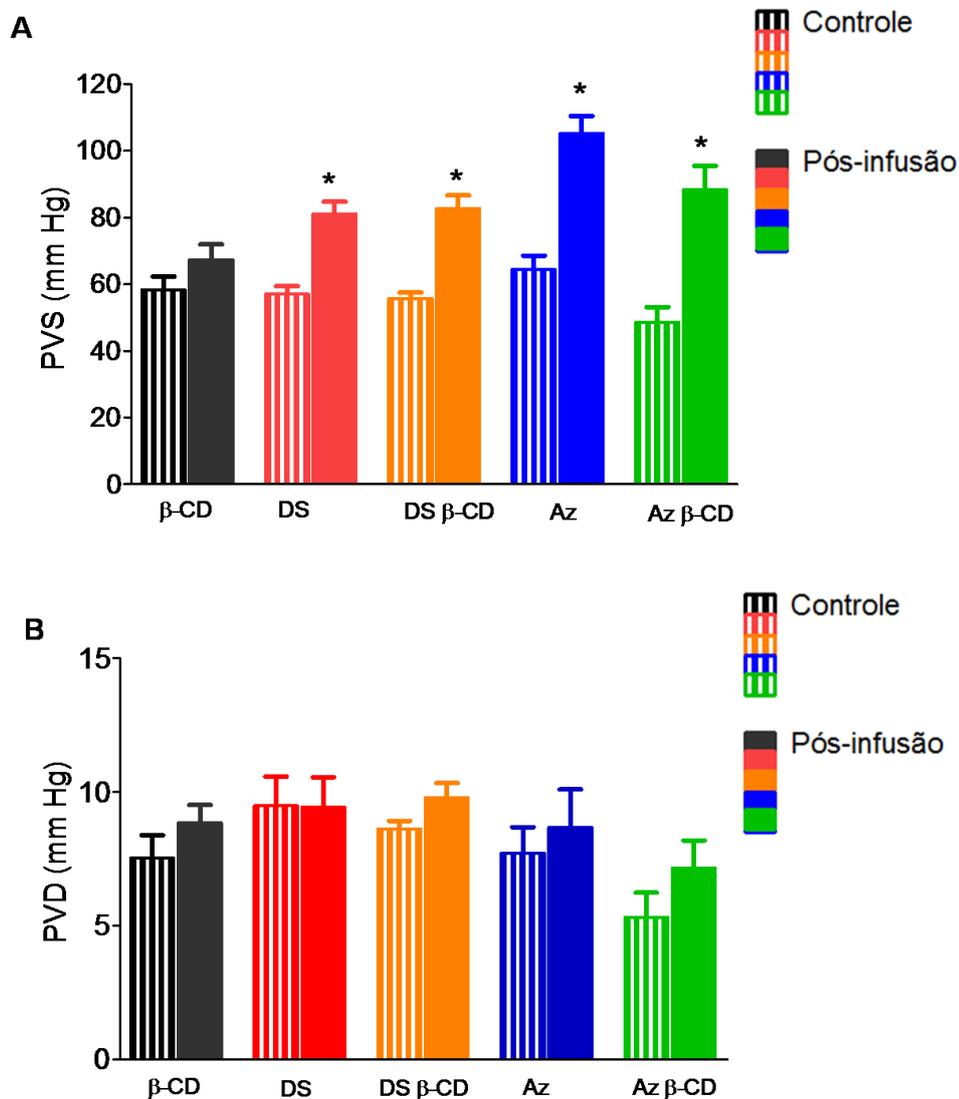


Figura 17. Efeito da administração em bolo de β -CD (2,5 mg/kg), DS, DS- β -CD, Az e Az- β -CD na PVS e na PVD de ratos. Os resultados representam a média \pm EPM (n= 6). * $P < 0,05$ versus controle (momento antes da administração da substância).

A Figura 18 mostra que a FC não foi modificada pela administração de β -CD (234,9 \pm 9,5 para 229,3 \pm 9,3 bpm), DS (231,4 \pm 14,2 para 227,7 \pm 16,0 bpm), DS β -CD (225,2 \pm 7,7 para 233,9 \pm 5,7 bpm), Az (246,1 \pm 11,7 para 283,6 \pm 29,8 bpm) e Az- β -CD (236,6 \pm 6,5 para 272,6 \pm 11,9 bpm).

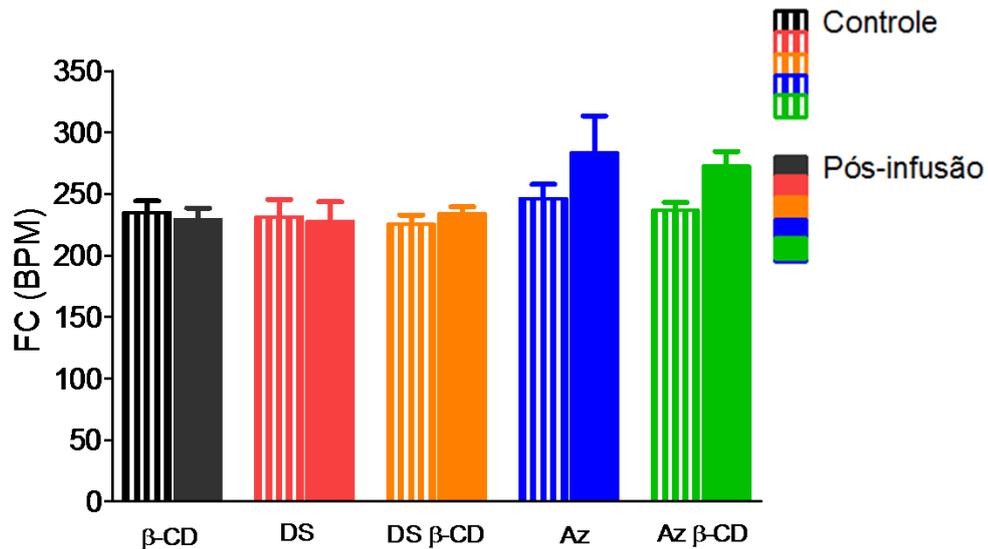


Figura 18. Efeito causado pela administração i.v. em bolo (2,5 mg/kg) de β -CD, DS, DS- β -CD, Az e Az- β -CD na FC de ratos. Os resultados representam a média \pm EPM (n= 6). * P <0,05 versus controle (momento antes da administração da substância).

A avaliação da cinética de contração e relaxamento do músculo ventricular em resposta a administração de β -CD, DS, DS- β -CD, Az e Az- β -CD está mostrada na Figura 19 A e B. O DS (2186 \pm 203 para 3798 \pm 625 mmHg/s), DS- β -CD (2348 \pm 200 para 3592 \pm 450 mmHg/s) e Az- β -CD (1299 \pm 128 para 2810 \pm 358 mmHg/s) aumentaram significativamente (P <0,05) a +dP/dt. Este aumento não foi observado com a administração de β -CD (2325 \pm 364 para 2452 \pm 298 mmHg/s) ou de Az (2384 \pm 340 para 3284 \pm 380 mmHg/s) (Figura 19A).

A taxa de relaxamento medida pela -dP/dt foi aumentada (P <0,05) pelo DS- β -CD (-1297 \pm 54 para -2514 \pm 237 mmHg/s), Az (-1659 \pm 190 para -3222 \pm 363 mmHg) e Az- β -CD (-914 \pm 86 para -2143 \pm 322 mmHg). Este parâmetro não foi modificado pela β -CD (-1373 \pm 242 para -1534 \pm 203 mmHg/s) ou DS (-1186 \pm 44 para -1620 \pm 350 mmHg/s) (Figura 19B).

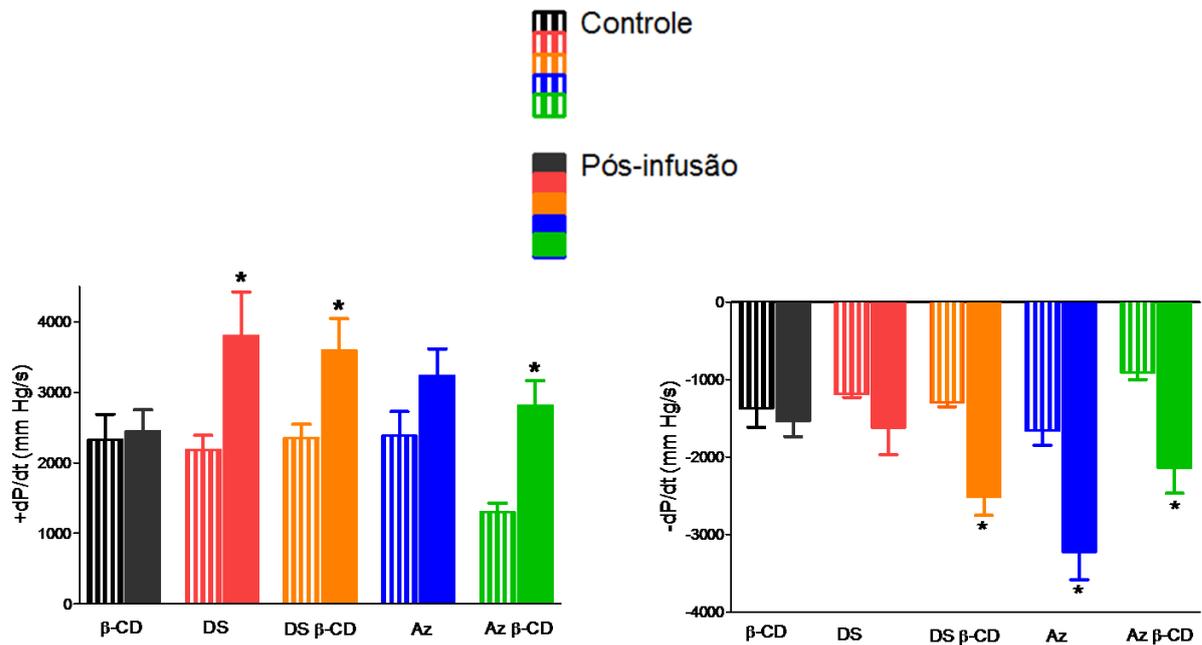


Figura 19. Efeito causado pela administração em bolo de β -CD, DS, DS- β -CD, Az e Az- β -CD na +dP/dt máxima e -dP/dt máxima medida no ventrículo esquerdo de ratos. Os resultados representam a média \pm EPM (n= 6). * P <0,05 versus controle (momento antes da administração da substância).

3.6 EFEITO DA DESNERVAÇÃO NA POSTURA DOS CAMUNDONGOS

Após 7 dias de desnervação, os animais foram levados para o local do experimento para avaliação da eficiência do procedimento cirúrgico. A Figura 20 mostram sinais de paralisia muscular na pata esquerda (Figura 20B) comparada a pata contralateral não desnervada (Figura 20A).

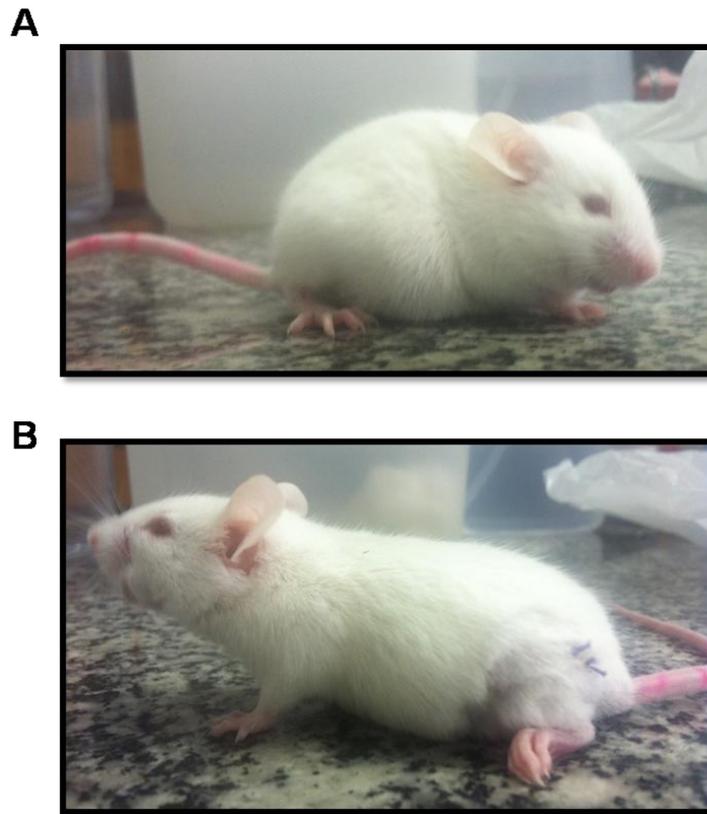


Figura 20. Fotografia de um camundongo submetido a lesão do nervo ciático na pata esquerda. Note ausência de sinais de paralisia e espasticidade na pata contralateral (Figura 20A) e presença destes sinais na pata esquerda (Figura 20B) 7 dias após a cirurgia.

3.7 ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS CAUSADAS PELA DESNERVAÇÃO EM MÚSCULOS DE CAMUNDONGOS

Ao final dos 7 dias após a desnervação, os animais foram pesados, anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical para retirada dos músculos esqueléticos, e esses pesados e medidos. Como apresentado na Tabela 4, o peso corporal dos animais desnervados não foi modificado. Entretanto, o peso dos músculos da pata desnervada reduziu, sem alterar, o comprimento. O peso do EDL das patas direita e esquerda dos animais controle foi de $15,4 \pm 1,4$ mg e $15,6 \pm 2,0$ mg, respectivamente ($P > 0,05$), e a do SOL de $18,4 \pm 2,1$ mg e $18,5 \pm 1,3$ mg, respectivamente ($P > 0,05$).

O peso dos músculos EDL e SOL reduziu em ambas as patas nos animais submetidos a desnervação da pata esquerda (Tabela 4). Assim, o peso do EDL das

patas direita e esquerda foi de $10,0 \pm 1,8$ mg e $9,2 \pm 0,9$ mg, respectivamente ($P < 0,05$), e a do SOL de $12,0 \pm 0,7$ mg e $11,4 \pm 1,4$ mg, respectivamente ($P < 0,05$).

Tabela 4: Características morfométricas dos músculos esqueléticos e peso corporal dos animais. Os dados da tabela representam média \pm EPM ($n = 6$).

PESO CORPORAL	CONTROLE		LESÃO	
Peso (g)	$30 \pm 0,1$		$28 \pm 0,5$	
Músculo EDL	CONTROLE		LESÃO	
	D	E	D	E
Peso (mg)	$15,4 \pm 1,4$	$15,6 \pm 2,0$	$10,0 \pm 1,8^*$	$9,2 \pm 0,9^*$
Comprimento (cm)	$1,1 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,7$	$1,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$
Músculo SOL	CONTROLE		LESÃO	
	D	E	D	E
Peso (mg)	$18,4 \pm 2,1$	$18,5 \pm 1,3$	$12,0 \pm 0,7^*$	$11,4 \pm 1,4^*$
Comprimento (cm)	$0,9 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$

3.8 RELAÇÃO ENTRE CONTRATURA INDUZIDA PELA CAFEÍNA COM O TEMPO DE DESNERVAÇÃO DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE CAMUNDONGOS

As Figuras 21 e 22 mostram diferenças na intensidade das contrações em função do tempo pós-desnervação (7, 14 e 21 dias). Observa-se aumento da intensidade de contração em resposta ao aumento da concentração de cafeína nos músculos EDL (Figura 21) e SOL (Figura 22) contralateral e no lado desnervado. Aumento da resposta à cafeína é observado em função do tempo de desnervação, porém, mais evidente nos músculos EDL e SOL das patas desnervadas.

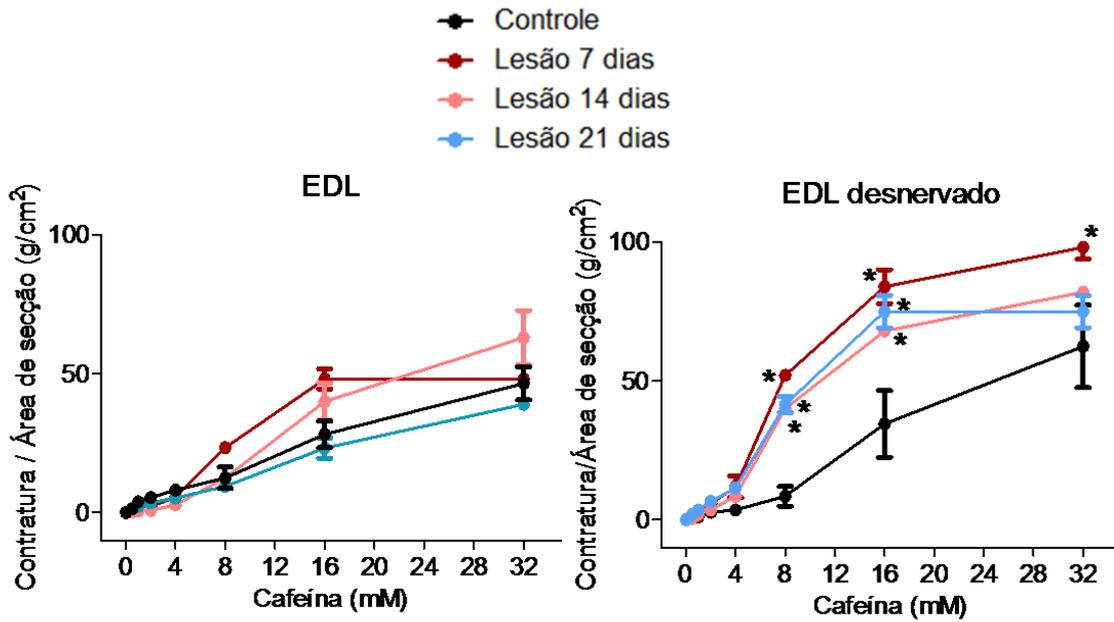


Figura 21. Efeito da desnervação na contração induzida por cafeína dos músculos EDL de camundongos pelo período de 7, 14 e 21 dias. Esquerda: EDL da pata contralateral; Direita: EDL da pata desnervada. Os resultados representam a média \pm EPM (n= 6). * $P < 0,05$ versus controle (sem lesão e sem tratamento com substância).

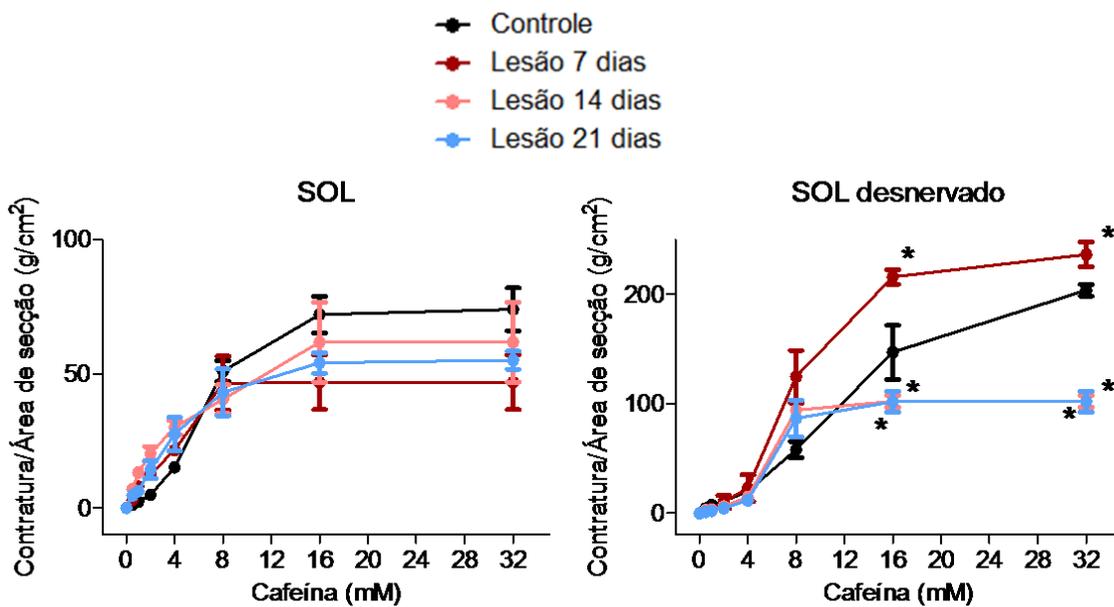


Figura 22. Efeito da desnervação na contração induzida por cafeína nos músculos SOL de camundongos pelo período de 7, 14 e 21 dias. Esquerda: SOL da pata contralateral; Direita: SOL da pata desnervada. Os resultados representam a média \pm EPM (n= 6). * $P < 0,05$ versus controle (sem lesão e sem tratamento com substância).

3.9 EFEITO DE β -CD, DS E DS β -CD NA REDUÇÃO DA CONTRATURA INDUZIDA PELA CAFEÍNA EM ANIMAIS DESNERVADOS

A resposta contrátil à cafeína dos músculos EDL e SOL de camundongos desnervados é mostrada nas Figuras 23 e 24. Estes animais foram tratados com as substâncias em estudo (25 mg/kg v.o.) durante 7 dias.

No músculo EDL da pata contralateral apenas DS reduziu a contratura induzida pela cafeína de maneira significativa em relação ao controle (sem lesão e sem substância) nas concentrações de 8 e 16 mM. A eficiência em reduzir a contratura pela cafeína no músculo EDL da pata desnervada foi observada com DS e DS β -CD. Após exposição a β -CD pura, a contratura do músculo EDL se mostrou aumentada nas concentrações iniciais, porém na concentração de 32 mM, o resultado da β -CD foi semelhante ao visto no músculo controle. Entretanto, DS e DS β -CD se mostraram mais eficazes na redução da contratura dos músculos EDL desnervados.

Os resultados alcançados no músculo SOL foram semelhantes ao do músculo EDL, e nesse músculo a β -CD pura não causou resultados significativos na indução do relaxamento da contratura induzida pela cafeína. É possível observar a alta eficácia de DS e DS β -CD na redução da contratura dos músculos desnervados, após tratamento por 7 dias, em relação ao grupo controle.

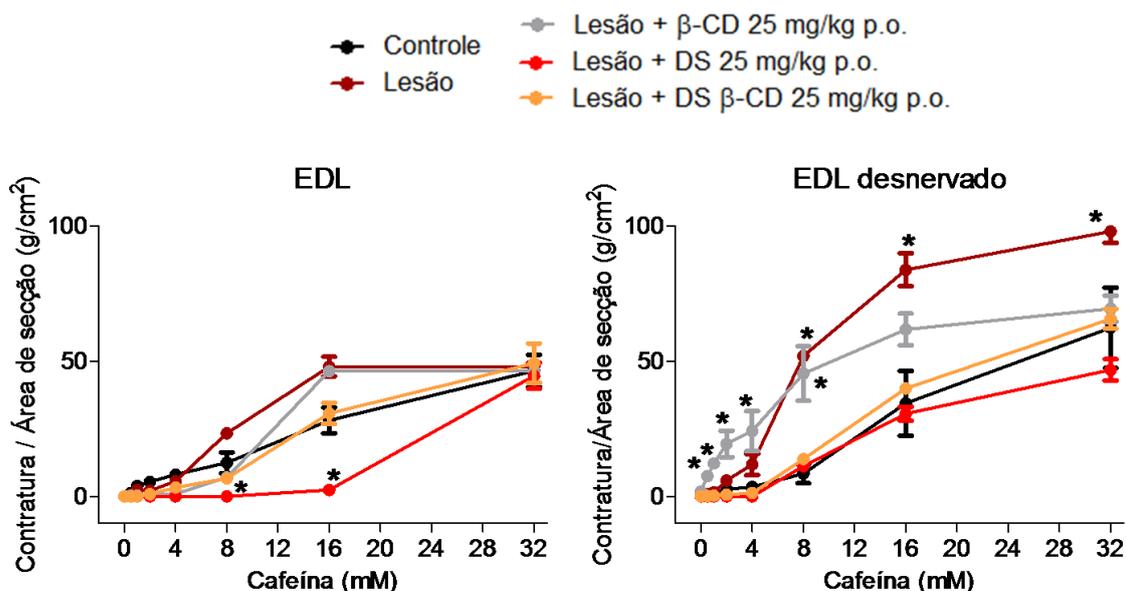


Figura 23. Curva concentração-resposta na contração induzida por cafeína dos músculos EDL de camundongos desnervados pelo período de 7 dias e tratados pelo mesmo período com a dose de 25 mg/kg/dia (v.o.) de cada substância indicada na figura. Os resultados representam a média \pm EPM (n= 6). *P<0,05 versus controle (sem lesão e sem tratamento com substância).

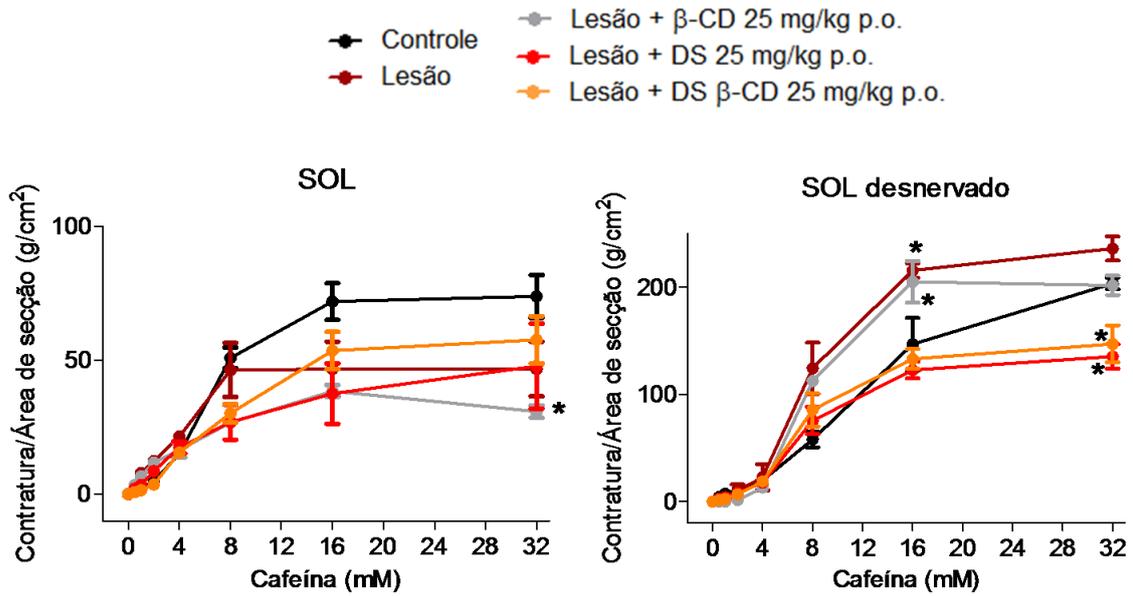


Figura 24. Curva concentração-resposta na contração induzida por cafeína dos músculos SOL de camundongos desnervados pelo período de 7 dias e tratados pelo mesmo período com a dose de 25 mg/kg/dia (v.o.) de cada substância indicada na figura. Os resultados representam a média \pm EPM (n= 6). *P<0,05 versus controle (sem lesão e sem tratamento com substância).

4 DISCUSSÃO

O DS é a única substância atualmente disponível para tratar a crise de HM. É utilizado também para o tratamento de outras intercorrências médicas, como a síndrome neuroléptica maligna (MARELLI et al, 1996), intoxicação por ecstasy (WEBB;WILLIAMS, 1993) e, principalmente, no auxílio ao tratamento de espasticidade (CHOU; PETERSON; HELFAND, 2004, KHEDER; NAIR, 2012). Embora eficiente, o seu uso clínico para o tratamento da HM tem sido muito dificultado em função da baixa solubilidade na água (DRIESSEN, WUIS e GIELE, 1985). Além disso, a disponibilidade de DS nos hospitais no Brasil ainda é deficiente devido ao elevado custo. A reversão da crise de HM deve ser rápida porque a precocidade de ação terapêutica além de impedir a morte, evita sequelas aos sobreviventes. Para vencer estas dificuldades, duas estratégias básicas têm sido tentadas nos últimos anos: 1) modificar a solubilidade do dantrolene; 2) planejar e sintetizar novas substâncias baseadas no protótipo dantrolene.

Neste sentido, um análogo mais solúvel do que DS denominado Az foi sintetizado em 1987 (WHITE et al, 1987). Dados do nosso laboratório mostraram que o Az é tão potente quanto o DS tanto *in vitro* quanto *in vivo* em modelo de porcos suscetíveis a HM (SUDO et al, 2007).

Este trabalho teve como proposta caracterizar a atividade de DS e Az incorporados em β -CD na contratilidade de músculos esqueléticos partindo da premissa que esta preparação aumentaria a solubilidade destes princípios ativos. Diferente dos relatos que indicam dificuldades para se dissolver o DS, o pó liofilizado do DS ou Az incorporados em β -CD foi instantaneamente dissolvido em água. No caso do DS, a incorporação em β -CD aumentou sua solubilidade em cerca de 6 vezes, ou seja, terapeuticamente seria utilizado volume proporcionalmente menor. Em termos numéricos, com o uso do DS na sua forma disponível são administrados cerca de 450 ml de líquido (FLEWELLEN et al, 1983) para tratar uma crise de HM, baseado na dose preconizada de 2,5 mg/kg i.v. e solubilidade máxima de 0,33 mg/kg (KRAUSE et al, 2004). A preparação do DS em β -CD reduziria o volume administrado para 75 ml. Além desta questão numérica não se pode ignorar os fatos de que a solubilização do DS atual é realizada em água a 37° C, requer 2 a 3 profissionais para o preparo e administração e, mesma assim, é necessário o uso de filtro para impedir a administração de partículas não solubilizadas ao paciente (KRAUSE et al, 2004).

No caso do Az incorporado em β -CD, considerando a sua potência semelhante ao DS (SUDO et al, 2007), o volume administrado seria de 15 ml, perfeitamente preparável numa ampola, convencionalmente disponibilizada para uso clínico.

Neste trabalho foram avaliados os efeitos resultantes da incorporação de DS e do Az em β -CD na contratilidade de músculos esqueléticos, normais e espásticos, objetivando o seu uso no tratamento da HM e da espasticidade. Esta forma de testar novos candidatos a fármacos para tratar crise de HM já é conhecida desde o desenvolvimento do DS (SNYDER et al, 1967) e pode ser estendida para à espasticidade muscular.

Na avaliação *in vitro*, a potência da forma DS β -CD reduziu significativamente no EDL, mas este efeito não foi visto no SOL. Por outro lado, o Az e o Az β -CD tiveram eficácias e potências muito mais próximas nos dois tipos de músculos. Os músculos usados nestes testes são diferentes quanto o aspecto morfológico, funcional e bioquímico. O EDL constituído de fibras brancas, abalos rápidos, tem metabolismo glicolítico, enquanto que, o SOL constituído de fibras vermelhas e abalos lentos tem metabolismo oxidativo (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). A pequena diferença entre o Az e Az β -CD em ambos os músculos faz pensar que a incorporação em β -CD não modifica a concentração da forma ativa dos compostos na biofase. Então esta diferença resulta da diferente funcionalidade de fibras musculares.

Não sabemos ainda qual a importância terapêutica de termos diferente seletividade de ação da forma incorporada a β -CD. Porém, se não houve diferença em fibras lentas, é provável que no homem este fato não seja tão relevante uma vez que os músculos humanos são constituídos de uma mistura de fibras rápidas e lentas. Esta hipótese foi confirmada nos experimentos *in vivo* na qual a incorporação em β -CD não modificou a potência depressora dos abalos musculares do gastrocnêmio, constituído de fibras rápidas e lentas. Ausência de diferença dos sais DS e Az neste músculo havia sido demonstrado previamente (SUDO et al, 2007).

A incorporação em β -CD na tentativa de aumentar a solubilidade tem sido estratégia bastante usada e aprovada pelo órgãos regulatórios (DAVIS; BREWSTER, 2004). Como exemplos temos a incorporação do antitumoral citrato de ródio II (SINISTERRA et al, 1999) e do antiparasitário albendazol (GARCÍA et al, 2014).

Segurança é um item bastante importante no desenvolvimento de fármacos e medicamentos. Resultados deste trabalho mostraram que a administração intravenosa de DS, DS β -CD e Az β -CD aumenta PVS sem modificar a PVD em ratos, indicando ausência de efeito vascular. O aumento da PVS é compatível com aumento da $+dP/dt$ causada com todas as substâncias testadas, ou seja, um efeito inotrópico positivo. Aumento na $-dP/dt$ indicam que DS, DS β -CD e Az β -CD aceleram a velocidade de relaxamento do músculo cardíaco sugerindo aumento da taxa de decaimento da concentração de Ca^{2+} no mioplasma. Substâncias com este perfil reduzem a concentração deste cátion no mioplasma durante a diástole e impedem a ativação de arritmias.

Em função dos efeitos hemodinâmicos observados, os compostos testados podem ser úteis na terapêutica da crise de HM que incluem hipotensão arterial, redução do débito cardíaco e arritmias (LARACH et al, 2010).

É bem estabelecido que o DS e Az deprimem a contratilidade do músculo esquelético (SUDO et al, 2007) cuja a ação destas substâncias está vinculada a isoforma do receptor da rianodina tipo 1 (RyR1). A presença de uma diferente isoforma no coração (RyR2) de baixa afinidade ao DS (KOBAYASHI et al, 2009) podem justificar a ausência de depressão miocárdica. Deve-se ressaltar também que a β -CD pura não alterou os parâmetros hemodinâmicos, sendo esse fator vantajoso para a sua utilização na clínica.

No conjunto de dados obtidos com os músculos esqueléticos de camundongos, cobaios e ratos, observou-se efeito depressor dos abalos mesmos após a inclusão em β -CD, importante na reversão da HM cuja contratilidade muscular intensa e outras alterações musculares são relatadas em cerca de 80% dos casos (LARACH et al, 2010). Esses resultados nos motivaram a investigar o efeito dessas substâncias em outra condição clínica que também cursam com espasticidade muscular.

O uso de dantrolene na reversão da espasticidade resulta na melhora da funcionalidade das partes comprometidas e redução da dor (BARNES et al, 2001). É utilizado até hoje, principalmente em casos de intolerância do paciente à outros fármacos, onde é associado à outras substâncias (KRAUSE et al, 2004).

Um dos modelos para causar a espasticidade é a secção total unilateral do nervo ciático (EATON et al, 2003). Os animais submetidos a desnervação apresentaram retração da pata desnervada acompanhada de elevada dificuldade em

apoiá-la no chão. Essa mesma característica postural é observada em modelos de dor neuropática induzida pela a injúria constrictiva do nervo ciático (WANG; WANG, 2003). Uma importante alteração observada nos animais espásticos foi a redução do peso dos músculos (atrofia), mas não nos seus comprimentos, sugestivo de ausência de retração dos músculos ou de seus tendões. Atrofia muscular é um sinal bastante frequente nos pacientes com espasticidade. Além disso, nos achados histológicos preliminares esse parâmetro foi observado de forma modesta e mais pronunciada no SOL, com destruição das fibras musculares e substituição das mesmas por tecido conjuntivo (em andamento).

A intensa contratura vista na crise de HM resulta de aumento da concentração de Ca^{2+} mioplasmático. A cafeína, substância capaz de ativar o RyR1 provocando o efluxo de Ca^{2+} pelo RS e usada para o diagnóstico de HM (LARACH et al, 1989) aumentou a intensidade da contratura do EDL e SOL em função do tempo de desnervação. O descontrole na regulação da concentração mioplasmática de Ca^{2+} pode ser notada no músculo desnervado, cuja contratura induzida pela cafeína foi significativamente maior em comparação ao músculo não-desnervado. A avaliação do efeito de DS e DS β -CD nesses músculos mostrou primeiramente que a presença de fibras rápidas ou lentas não parece interferir de forma marcante na resposta depressora dessas substâncias. O aumento da contratura causada pela cafeína observado no EDL e no SOL desnervados foi reduzido por DS e DS β -CD. DS foi a substância mais eficaz no EDL da pata contralateral corroborando o que também foi visto em experimentos *in vitro*, onde a CI_{50} de DS foi de 1,6 μ M. Este resultado sugere que o principio ativo, DS, incorporado ou não a β -CD atinge o alvo de ação nos músculos após administração oral.

Irwin e Brinton (2014) relatam que as ciclodextrinas, quando administradas *in vivo*, podem formar complexos de inclusão com outras moléculas pequenas, incluindo outros fármacos presentes na circulação sanguínea, e moléculas endógena, incluindo esteróides e colesterol (IRWIN;BRINTON, 2014). Artigos publicados recentemente relacionando o efeito das ciclodextrinas nos músculos esqueléticos e junções neuromusculares indicam depleção do colesterol do sarcolema das fibras musculares, alterando a condutividade da membrana excitável pós-juncional e principalmente nos túbulos T, área enriquecida com colesterol de membrana (LAUNIKONIS; STEPHENSON, 2001, POSSIDONIO et al, 2014). Essa redução na condutividade do sarcolema teria como consequência a redução da força

contrátil, ou seja, maior relaxamento muscular. Foi observado no presente trabalho redução dos abalos e da contratatura muscular, quando utilizados substâncias incorporadas em β -CD, assim como pela β -CD pura, visto que no EDL e SOL, ela por si só mostrou efeito, apenas, na maior concentração de cafeína, após tratamento crônico por 7 dias. Sugere-se então que possa haver uma contribuição, mesmo que pequena, da β -CD no efeito relaxante dos músculos quando estes ficam expostos cronicamente à β -CD. Vale ressaltar também que nos músculos saudáveis, não desnervados, β -CD pura não demonstrou efeito significativo.

Outro fato já conhecido é que o aumento da solubilidade de compostos incorporados em ciclodextrina promove uma diminuição da permeabilidade intestinal. Esse fenômeno é visto com detalhes no recente trabalho de BEIG; AGBARIA; DAHAN (2013). Essa informação é de extrema importância para análise farmacocinética do tratamento oral com fármacos incorporados à β -CD, por exemplo.

Sabe-se também que o uso de ciclodextrinas é utilizado para aumentar a biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade dos fármacos, entre outras aplicações (DAVIS; BREWSTER, 2004). A questão da biodisponibilidade é de extrema importância para análise farmacocinética do tratamento oral com fármacos incorporados à CDs. Fármacos mais solúveis devido à incorporação em CDs tem a biodisponibilidade aumentada na superfície de ação, pois estas possibilitam mais substância disponível na membrana de absorção (BEIG; AGBARIA; DAHAN, 2013) Assim, tanto o efeito agudo quanto o crônico das substâncias incorporadas à ciclodextrinas em músculos esqueléticos, saudáveis ou espásticos, pode ser benéfico visto que a substância terá maior hidrossolubilidade e biodisponibilidade, com efeito semelhante à substância não incorporada.

5 CONCLUSÃO

1. A incorporação do DS e Az em β -CD, sem interferência significativa na eficácia e potência, permitirá o uso de volume 6 a 30 vezes menor, respectivamente, para o tratamento da HM;
2. A ausência de efeitos adversos cardiovasculares após administração intravenosa em bolo sugere segurança do uso de DS β -CD e Az β -CD para o tratamento da crise de HM;
3. A eficiência do DS incorporado à β -CD administrado pela via oral em reduzir a contratatura muscular aumentada pela desnervação sugere o seu uso para o tratamento de doenças que cursam com espasticidade muscular.

6 REFERÊNCIAS

ADA, L.; DORSCH, S.; CANNING, C.G. Strengthening interventions increase strength and improve activity after stroke. **Aust. J. Physiother.** v. 52, p. 241–8. 2006.

ALEMAN, M.; RIEHL, I.; ALDRIDGE, B.M.; LECOUNTER, R.A.; STOTT, J.L.; PESSAH, I.N. Association of a mutation in the ryanodine receptor 1 gene with equine malignant hyperthermia. **Muscle Nerve.** v. 30, p. 356-65. 2004.

ALLEN, G.C.; LARACH, M.G.; KUNSELMAN, A.R. The sensitivity and specificity of the caffeine-halotane contracture test: a report from the North American Malignant Hyperthermia Registry. The North American Malignant Hyperthermia Registry of MHAUS. **Anesthesiology.** v. 8, p. 579-88. 1998.

ALLEN, P.D.; LOPEZ, J.R.; SÁNCHEZ, V.; RYAN, J.F.; SRETER, F.A. EU 4093 decreases intracellular $[Ca^{2+}]$ in skeletal muscle fibers from control and malignant hyperthermia - susceptible swine. **Anesthesiology.** v. 76, p. 132-138. 1992

DIRKSEN, R.T.; AVILA, G. Altered ryanodine receptor function in central core disease: leaky or uncoupled $Ca(2+)$ release channels? **Trends Cardiovasc Med.** v.12, p. 189–97. 2002

BALSHAW, D.M.; YAMAGUCHI, N.; MEISSNER, G. Modulation intracellular calcium-release channels by calmodulin. **J. Memb. Biol.** v, 185, p.1-8. 2002.

BANNISTER, R. A. Dantrolene-Induced Inhibition of Skeletal L-Type Ca^{2+} Current Requires RyR1 Expression. **Biomed Res. Int.** v. 2013, Article ID 390493, 10 páginas. 2013.

BARNES, M.P. Spasticity: a rehabilitation challenge in the elderly. **Gerontology.** v. 47, p. 295–9. 2001.

BEIG, A.; AGBARIA R.; DAHAN, A. Oral delivery of lipophilic drugs: the tradeoff between solubility increase and permeability decrease when using cyclodextrin-based formulations. **PLoS ONE** v. 8(7), e68237. 2013.

BRANDOM, B.W.; LARACH, M.G. The North American Malignant Hyperthermia Registry. Reassessment of the safety and efficacy of dantrolene. **Anesthesiology;** v. 96, A1199. 2002

BRITT, B.A.; LOCHER, W.G.; KALOW, W. Hereditary aspects of malignant hyperthermia. **Can. Anaesth. Soc. J.** v. 16, p. 89-98, 1969.

BRITT, B.A.; KALOW, W. Malignant hyperthermia: a statistical review. **Can. Anaesth. Soc. J.** v. 17, p. 293-315. 1970.

BULLER, A.J.; ECCLES, J.C.; ECCLES, R.M. Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb. **J. Physiol.** v. 150, p. 399-416. 1960

CARMO, P.L.D. Azumolene: eficácia na reversão da crise de hipertermia maligna e toxicologia pré-clínica. Tese (Doutorado em Farmacologia e Química Medicinal). Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade

Federal do Rio de Janeiro, 2009.

CHAMLEY, D.; POLLOCK, N.A.; STOWELL, K.M.; BROWN, R.L. Malignant Hyperthermia in Infancy and Identification of Novel RyR1 Mutation. **Br. J. Anaesth.** v. 84, p. 500-4. 2000.

CHELU, M.G.; GOONASEKERA, S.A.; DURHAM, W.J.; TANG, W.; LUECK, J.D.; RIEHL, J.; PESSAH, I.N.; ZHANG, P.; BHATTACHARJEE, M.B.; DIEKSEN, R.T.; HAMILTON, S.L. Heat- and anesthesia-induced malignant hyperthermia in an RyR1 knock-in mouse. **FASEB J.** v. 20(2), p. 329-30. 2005.

CHOU, R.; PETERSON, K.; HELFAND, M. Comparative efficacy and safety of skeletal muscle relaxants for spasticity and musculoskeletal conditions: a systematic review. **J. Pain Symptom Manage.** v. 28(2), p. 140-75. 2004.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 28 (1), p.1-9. 2007.

DAVIS, M.E.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nat. Rev. Drug. Discov.** v. 3(12), p. 1023-35. 2004.

DENBOROUGH, M.A.; LOVELL, R.R.H. Anaesthetic deaths in a family. **Lancet** v. 2, p. 45. 1960.

DENBOROUGH, M.A.; FOSTER, J.F.A.; LOVELL, R.R.H.; MAOLESTONE, D.A.; VILLIERS, J.D. Anaesthetic deaths in a family. **Brit. J. Anaesth.** v. 34, p. 395-6. 1962.

DENBOROUGH, M.A. Malignant hyperthermia. **Lancet.** v. 352, p. 1131-6, 1998.

DOWLING, J.J.; LILLIS, S.; AMBURGEY, K.; ZHOU, H.; AL-SARRAJ, S.; BUK, S.J.; WRAIGE, E.; CHOW, G.; ABBS, S.; LEBER, S.; LACHLAN, K.; BARALLE, D.; TAYLOR, A.; SEWRY, C.; MUNTONI, F.; JUNGBLUTH, H. King-Denborough syndrome with and without mutations in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. **Neuromuscul. Disord.** v. 21, p. 420-7. 2011.

DRIESSEN, J.J.; WUIS, E.W.; GIELEN, M.J. Prolonged vecuronium neuromuscular blockade in a patient receiving orally administered dantrolene. **Anesthesiology.** v. 62(4), p. 523-4. 1985

DYKES, M.H. Evaluation of a muscle relaxant: dantrolene sodium (dantrium). **JAMA.** v. 231, p. 862-64. 1975.

EL-HAYEK, R.; PARNES, J.; VALDIVIA, H.H.; CORONADO, R.; HOGAN, H. Dantrolene and azumolene inhibit [³H]pn200-110 binding to porcine skeletal muscle dihydropyridine receptors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 182, p. 894-900. 1992.

EATON, M. Common animal models for spasticity and pain. **J. Rehabil. Res. Dev.** v. 40(4), p. 41 - 54. 2003.

ELTIT, J.M.; BANNISTER, R.A.; MOUA, O.; ALTAMIRANO, F.; HOPKINS P.M.; PESSAH, I.N.; MOLINSKI, T.F.; LÓPEZ, J.R.; BEAM, K.G.; ALLEN, P.D. Malignant hyperthermia susceptibility arising from altered resting coupling between the skeletal muscle L-type Ca²⁺ channel and the type 1 ryanodine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 109, p. 7923–8. 2012.

EMHG - European Malignant Hyperpyrexia Group: A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia susceptibility. **Brit. J. Anaesth.** v. 57, p. 1038. 1984

FILL, M.; COPELLO, J.A. Ryanodine receptor calcium release channels. **Physiol. Rev.** v. 82(4), p. 893-922. 2002.

FLEWELLEN, E.H.; NELSON, T.E.; JONES, W.P.; AREANS, J.F.; WAGNER, D.L. Dantrolene dose response in awake man: implications for management of malignant hyperthermia. **Anesthesiology.** v. 59, p. 275 - 80. 1993.

FREIERMUTH, D.; BANDSCHAPP, O.; IAIZZO, P.A. Heat production and the importance of temperature management in malignant hyperthermia. **Int. J. of Anesthesiology Res.** v. 1, p. 47-55. 2013

FRONTERA, W.R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Calcif. Tissue. Int.** 2014

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; DE LEON, S.; KHANNA, V.K.; WELER, J.E.; O'BRIEN, P.J.; MACLENNAN, D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science** v. 253, p. 448-51. 1991.

GARCÍA, A.; LEONARDI, D.; SALAZAR, M.O.; LAMAS, M.C. Modified β -cyclodextrin inclusion complex to improve the physicochemical properties of albendazole. complete in vitro evaluation and characterization. **PLoS One.** v. 9(2), e88234, 2014.

GOUSSAKOV, I.; MILLER, M.B.; STUTZMANN, G.E. NMDA-mediated Ca²⁺ influx drives aberrant ryanodine receptor activation in dendrites of young Alzheimer's disease mice. **J. Neurosci.** v. 30, p.12128 –37. 2010

GRACIES, J.M.; NANCE, P.; ELOVIC, E.; et al. Traditional pharmacological treatments for spasticity part I: local treatments. **Muscle Nerve** v. 20(6), p. 61–91. 1997

GROOM, L.; MULDOON, S.M.; TANG, Z. Z.; BRANDOM, B. W.; BAYARSAIKHAN, M.; BINA, S.; LEE, H.; QUI, X.; SAMBUUGHIN, N.; DIRKSEN, R.T. Identical *de novo* mutation in the type 1 ryanodine receptor gene associated with fatal, stress-induced malignant hyperthermia in two unrelated families. **Anesthesiology.** v. 115, p. 938–45. 2011.

HALL, L.W.; TRIM, C.M.; WOOLF, N. Further studies of porcine malignant hyperthermia. **Br. Med. J.** v. 15;2(5806), p. 145-8. 1972.

HAMILTON, S.L.; SERYSHEVA, I.I. Ryanodine receptor structure: progress and

challenges. **J. Biol. Chem.** v. 284(7), p. 4047-51. 2009.

HIRSHEY DIRKSEN, S.J.; LARACH, M.G.; ROSENBERG, H.; BRANDOM, B.W.; PARNES, J.; LANG, R.S. Future directions in malignant hyperthermia research and patient care. **Anesth. Analg.** v. 113, p. 1108–19. 2011.

IRWIN, R.W.; BRINTON, R.D. Allopregnanolone as regenerative therapeutic for Alzheimer's disease: translational development and clinical promise. **Prog. Neurobiol.** v. 113, p. 40-55. 2014.

JONES, E.W.; NELSON, T.E.; ANDERSON, I.L.; KERR, D.D.; BURNAP, T.K. Malignant hyperthermia of swine. **Anesthesiology** v. 36, p. 42-51. 1972.

JUNGBLUTH, H.; MULLER, C.R.; HALLIGER-KELLER, B.; BROCKINGTON, M.; BROWN, S.C.; FENG, L.; CHATTOPADHYAY, A.; MERCURI, E.; MANZUR, A.Y.; FERREIRO, A.; LAING, N. G.; DAVIS, M.R.; ROPER, H.P.; DUBOWITZ, V.; BYDDER, G.; SEWRY, C.A.; MUNTONI, F. Autosomal recessive inheritance of RYR1 mutations in a congenital myopathy with cores. **Neurology.** v. 59, p. 284–7. 2002.

KETEL, W.B.; KOLB, M.E. Long-term treatment with dantrolene sodium of stroke patients with spasticity limiting the return of function. **Curr. Med. Res. Opin.** v. 9, p. 161–9. 1984

KHEDER, A.; NAIR, K.P. Spasticity: pathophysiology, evaluation and management. **Pract Neurol.** v. 12(5), p. 289-98. 2012

KIM, J.Y.; CHUNG, S.; BANG, M.S.; SHIN, H.I.; LEE, S.U. Safety of low-dose oral dantrolene sodium on hepatic function. **Arch. Phys. Med Rehabil.** v. 92 (9), p. 1359-63. 2011

KIM, D.C. Malignant Hyperthermia. **Korean J. Anesthesiol.** v. 63 (5), p. 391-401. 2012

KOBAYASHI, S.; YANO, M.; SUETOMI, T.; ONO, M.; TATEISHI, H.; MOCHIZUKI, M.; XU, X.; UCHINOUMI, H.; OKUDA, S.; YAMAMOTO, T.; KOSEKI, N.; KYUSHIKI, H.; IKEMOTO, N.; MATSUZAKI, M. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 53(21), p. 1993-2005. 2009.

KOLB, M.E.; HORNE, M.L.; MARTZ, R. Dantrolene in human MH. **Anesthesiology.** v. 56, p. 254-62. 1982.

KOVACS, E.; XUB, L.; PASEK, D.A.; Regulation of ryanodine receptors by sphingosylphosphorylcholine: Involvement of both calmodulin-independent and -independent mechanisms. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 401, p. 281-6. 2010.

KRAUSE, T., GERBERSHAGEN, M.U., FIEGE, M., WEISSHORN, R., WAPPLER, F. Dantrolene - a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. **Anesthesia**, v. 59, p. 364-73. 2004.

LARACH, M.G.; Standardization of caffeine halothane muscle contracture test – North American Malignant Hyperthermia Group. **Anesth. Analg.** v. 69, p. 511-5. 1989.

LARACH, M.G.; GRONERT, G.A.; ALLEN, G.C., BRANDOM, B.W.; LEHMAN, E.B. Clinical presentation, treatment, and complications of malignant hyperthermia in North America from 1987 to 2006. **Anesth Analg.** v. 110(2), p. 498-507. 2010.

LAUNIKONIS, B.S.; STEPHENSON, D.G. Effects of membrane cholesterol manipulation on excitation–contraction coupling in skeletal muscle of the toad **J. Physiology**. v. 534(1), p.71–85. 2001.

LITMAN, R.S.; ROSENBERG, H. Malignant hyperthermia - Update on susceptibility testing. **JAMA**. v. 293, p. 2918-24. 2005.

LITTLEFORD, J.A.; PATEL, L.R.; BOSE, D.; CAMERON, C.B.; MCKILLOP, C.; Masseter muscle spasm in children: implications of continuing the triggering anesthetic. **Anesth. Analg.** v. 72(2), p.151-60. 1991.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. **J. Pharm. Sci.** v. 85(10), p. 1017-25. 1996.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int. J. Pharm.** v. 329(1-2), p. 1-11. 2007.

MacINTOSH, B.R.; HOLASH, R.J.; RENAUD, J.M. Skeletal muscle fatigue - regulation of excitation-contraction coupling to avoid metabolic catastrophe. **J. Cell. Sci.** v. 125, p. 2105-14, 2012.

MACKRILL, J.J., Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets. **Biochem. Pharmacol.** v. 79, p. 1535-43. 2010.

MARELLI, A.; BODINI, P.; DIZIOLI, P.; CHIODELLI, G.; GUARNERI, M.; BOLDORI, L. The neuroleptic malignant syndrome (NMS). A report of a clinical case with a protracted and recurrent course. A review of the literature. **Minerva Med.** v. 87, p. 45–51. 1996.

MARKS, A.R., Ryanodine receptors, FKBP12, and heart failure. **Front. Biosci.** v. 7, p. 970-7. 2002.

MICKELSON, J.R.; LOUIS, C.F. Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca²⁺ release channel, and cell Ca²⁺ regulation defects. **Physiol Rev.** v. 76(2), p. 537-92. 1996.

MURAYAMA, T.; KUREBAYASHI, N. Two ryanodine receptor isoforms in

nonmammalian vertebrate skeletal muscle: possible roles in excitation-contraction coupling and other processes. **Prog. Biophys. Mol. Bio.** v. 105(3), p. 134-44. 2010.

MUTLU, A.; LIVANELIOGLU, A.; GUNEL, M.K. Reliability of Ashworth and modified Ashworth scales in children with cerebral palsy. **BMC Musculoskelet. Disord.** v. 9, p. 44. 2008

NAGUIB, M.; FLOOD, P.; McARDLE, J.J.; BRENNER, H.R. Advances in neurobiology of the neuromuscular junction. **Anesthesiology** v. 96, p. 202–31. 2002.

NELSON, T. E. Porcine malignant hyperthermia: critical temperatures for in vivo and in vitro responses. **Anesthesiology** v. 73, p. 449–54. 1990.

NELSON, T.E. Malignant hyperthermia in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 198, p. 989-94. 1991.

NELSON, TE. Malignant hyperthermia: a pharmacogenetic disease of Ca⁺⁺ regulating proteins. **Curr. Mol. Med.** v. 2, p.347-69. 2002.

NELSON, T.E.; DENBOROUGH, M.A. Studies on normal human skeletal muscle in relation to the pathopharmacology of malignant hyperpyrexia. **Clin. Exp. Pharmacol. P.** v. 4, p. 315-22. 1977.

NELSON, T.E.; LIN, M.; ZAPATA-SUDO, G.; SUDO, R.T. Dantrolene sodium can increase or attenuate activity of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel; clinical implications. **Anesthesiology** v. 84, p. 1368-79. 1996.

PANDYAN, A.D.; GREGORIC, M.; BARNES, M.P. Spasticity: clinical perceptions, neurological realities and meaningful measurement. **Disabil. Rehabil.** v. 27, p. 2–6. 2005.

PAUL-PLETZER, K.; YAMAMOTO, T.; BHAT, M.B.; MA, J.; IKEMOTO, N.; JIMENEZ, L.S.; MORIMOTO, H.; WILLIAMS, P.G.; PARNES, J. Identification of a Dantrolene-binding Sequence on the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 34918-23. 2002.

PHILLIPS, M.S.; FUJII, J.; KHANNA, V.K.; DE LEON, S.; YOKOBATA, K.; DE JONG, P.J.; MACLENNAN, D.H. The structural organization of the human skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. **Genomics** v. 34, p. 24-41. 1996.

PINDER, C.; BHAKTA, B.; KODAVALI, K. Intrathecal phenol: an old treatment revisited. **Disabil. Rehabil.** v. 30, p. 381–6. 2008

PIRONE, A.; SCHREDELSEKER, J.; TULUC, P.; GRAVINO, E.; FORTUNATO, G.; FLUCHER, B.E.; CARSANA, A.; SALVATORE, F. GRABNER, M. Identification and functional characterization of malignant hyperthermia mutation T1354S in the outer pore of the Cav α 1S-subunit. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** v. 299, p. 1345–54. 2010

POPUGAEVA, E.; BEZPROZVANNY, I. Role of endoplasmic reticulum Ca²⁺

signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease. **Front. Mol. Neurosci.** v. 6, artigo 29. 2013

POSSIDONIO, A.C.; MIRANDA, M.; GREGORACCI, G.B.; THOMPSON, F.L.; COSTA, M.L.; MERMELSTEIN, C. Cholesterol depletion induces transcriptional changes during skeletal muscle differentiation. **BMC Genomics.** v. 15, p. 544. 2014.

RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins In vivo drug delivery. **J. Pharm. Sci.** v. 85(11), p. 1142-69. 1996.

ROBERTS, M.C.; MICKELSON, J.R.; PATTERSON, E.E.; NELSON, T.E.; ARMSTRONG, P.J.; BRUNSON, D.B.; HOGAN, K. Autosomal dominant canine malignant hyperthermia is caused by a mutation in the gene encoding the skeletal muscle calcium release channel (RYR1). **Anesthesiology** v. 95, p. 716-25. 2001.

ROSENBERG, H.; FLETCHER, J.E. An Update on the Malignant Hyperthermia Syndrome. **Ann. Acad. Med. Singapore** v. 23, p. 84-97. 1994.

ROSENBERG, H.; DAVIS, M.; JAMES, D.; POLLOCK, N.; STOWELL, K.; Malignant hyperthermia. **Orphanet J. Rare Dis.** v. 2, p. 1-14. 2007.

ROSENBERG, H.; SAMBUUGHIN, N.; RIAZI, S., DIRKSEN, R. Malignant Hyperthermia Susceptibility. **GeneReviews® [Internet]**. Atualizado em 31 janeiro 2013. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1146/?report=classic>

RxList. The Internet Drug Index <http://www.rxlist.com>. Acessado em 01/12/2014.

SAMSO, M.; WAGENKNECHT, T.; ALLEN, P.D. Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM. **Nature Struct. Biol.** v. 12(6), p. 539-44. 2005.

SATKUNAM, L.E. Rehabilitation medicine: 3. Management of adult spasticity. **CMAJ.** v. 169(11), p. 1173-9. 2003.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiol. Rev.** v. 91(4), p. 1447-531. 2011.

SCHIAFFINO S.; DYAR, K.A.; CICILLOT, S.; BLAAUW, B.; SANDRI, M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS J.** v. 280, 4294–314. 2013

SINISTERRA, R.; SHASTRI, V.; NAJJAR, R.; LANGER, R. Encapsulation and release of rhodium (II) citrate and its association complex with hydroxypropyl- β -cyclodextrin from biodegradable polymer microspheres. **J. Pharm. Sci.** v. 88 (5) p. 574-6. 1999.

SMANIA, N.; PICELLI, A.; MUNARI, D.; et al. Rehabilitation procedures in the management of spasticity. **Eur. J. Phys. Rehabil.**

Med. v. 46, p. 423–38. 2010.

SNYDER, H.R. JR.; DAVIS, C.S.; BICKERTON, R.K.; HALLIDAY, R.P. 1-[(5-arylfurfurylidene)amino]hydantoin: a new class of muscle relaxants. **J. Med. Chem.** v. 10(5), p. 807-10. 1967.

STEWART, S.L.; HOGAN, K.; ROSENBERG, H.; FLETCHER, J.E. Identification of the Arg1086His mutation in the alpha subunit of the voltage-dependent calcium channel (CACNA1S) in a North American family with malignant hyperthermia. **Clin. Genet.** v. 59, p. 178–84. 2001.

SUDO, R.T.; CARMO, P.L.; TRACHEZ, M.M.; ZAPATA-SUDO, G.; Effects of Azumolene on Normal and Malignant Hyperthermia-susceptible Skeletal Muscle. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** v. 102, p. 308-16. 2008.

TONIN, M.D.L., Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados N-acilidrazônicos candidatos a fármacos úteis no tratamento da hipertermia maligna. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Química Medicinal). Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. **Chem. Pharm. Bull.** v. 52(8), p. 900-15. 2004.

WANG, L.X.; WANG, Z.J. Animal and cellular models of chronic pain. **Adv. Drug Deliver. Rev.** v. 55, p. 949-65. 2003.

WAPPLER, F. Malignant hyperthermia. **Eur. J. Anaesthesiol.** v. 18, p. 632–52. 2001
WEBB, C.; WILLIAMS, V. Ecstasy intoxication: appreciation of complications and the role of dantrolene. **Anaesthesia.** v. 48, p. 542–3. 1993

WEISS, R.G.; O'CONNELL, K.M.; FLUCHER, B.E.; ALLEN, P.D.; GRABNER, M.; DIRKSEN, R.T. Functional analysis of the R1086H malignant hyperthermia mutation in the DHPR reveals an unexpected influence of the III-IV loop on skeletal muscle EC coupling. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** v. 287, p. 1094–102. 2004.

WHITE, R.L.Jr.; WESSELS, F.L.; SCHWAN, T.J.; ELLIS, K.O. 1-[[[5-(substituted phenyl)-2-oxazolyl]methylene]amino]-2,4- imidazolidinediones, a new class of skeletal muscle relaxants. **J. Med. Chem.** v. 30, p. 263-6. 1987.

WIDMAIER, E.P.; RAFF, H.; STRANG, K.T. Vander's Human Physiology. **McGraw-Hill Higher Education**, 2005

WOLFE, R.R. The underappreciated role of muscle in health and disease. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 84, p. 475-82. 2006

YANG, T., RIEHL, J., ESTEVE, E., MATTHAEI, K.I., GOTH, S., ALLEN, P.D., PESSAH, I.N., LOPEZ, J.R., Pharmacologic and Functional Characterization of Malignant Hyperthermia in the R163C Knock-in Mouse. **Anesthesiology** v. 105, p. 1164-75. 2006

YU, G.; ZUCCHI, R.; RONCA-TSTONI, S.; RONCA, G. Protection of ischemic rat heart by dantrolene, an antagonist of the sarcoplasmic reticulum calcium release channel. **Basic Res Cardiol.** v. 95(2), p. 137-43. 2000.

ZAHAVI, A.; GEERTZEN, J.H.; MIDDEL, B.; et al. Long term effect of intrathecal baclofen on impairment, disability and quality of life in patients with severe spasticity of spinal origin. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** v. 75, p. 1553–7. 2004.

ZHAO, F.; LI, P.; CHEN, S.R.W.; LOUIS, C.F.; FRUEN, B.R. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels: molecular mechanism and isoform selectivity. **J. Biol. Chem.** v. 276(17), p. 13810-6. 2001