

FCM

LEA RODRIGUES SIMIONI

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS AÇÕES DO McN-A-343 NA JUNCÃO NEU-  
ROMUSCULAR.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Mè-  
dicas da Universidade Estadual de Campinas ,  
para a obtenção do título de Doutor.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Oswaldo Vital Brazil

LEA RODRIGUES SIMIONI

Professor Assistente no Departamento  
de Farmacologia da Faculdade de Ciências  
Médicas - UNICAMP - Campinas - São Paulo

" ... Se alguém julga saber alguma coisa, com efeito não aprendeu ainda como convém saber". I. Cor. 8:2.

À minha mãe, ao  
Gino e à nossa  
filha Viviane.

## A g r a d e ç o

- ao Professor Oswaldo Vital Brazil, pelo apoio dispensado na elaboração deste trabalho e cuja seriedade e dedicação à pesquisa, serve de exemplo a todos que se iniciam na carreira científica.

- ao Professor Alexandre Pinto Corrado, por acompanhar de perto o desenvolvimento desta tese, tornando possível a sua realização e cujo dinamismo e entusiasmo pela ciência transmite a todos com quem entra em contato.

- ao colega Marcos Dias Fontana, por ter-me iniciado na técnica eletrofisiológica, além da sua pronta e valiosa colaboração.

- aos colegas Julia Prado Franceschi e Urbano Morato Ferraz Meirelles, pelas sugestões e incentivo constantes como demonstração de amizade e apreço.

- ao Dr. Aquiles Piedrabuena e Dr. Ivanhoe Baracho, pela orientação segura e amigável na execução das análises estatísticas.

- ao colega Wilian Alves Prado, pela substancial contribuição e auxílio em experiências e pesquisa de dados bibliográficos.

- ao Dr. Antonio Carlos Martins Camargo, pela orientação espontânea e precisa sobre o método de dosagem da atividade anticolinesterásica "in vitro".

- ao Dileo Salviano dos Reis, Nadim Farah Heluany, Maria de Jesus Ferreira de Carvalho, José Bandeira, Adilson J. Thomaz, Gildo B. Leite, pelos serviços técnicos e auxiliar cuja contribuição foi de grande valor na elaboração deste trabalho.

- ao Sr. Waldemar Fantini e Pedro e Leonilda Gimenez, pelo cuidado com que realizaram o serviço fotográfico.

- ao Sr. Helgio de Lacerda Werneck, Cris  
tina Pretti e Sr. Clodomiro Rodrigues, pelos serviços de dede  
senho.

- à Maria Carolina dos Santos e Maria  
Elidia dos Santos, pelos serviços de datilografia.

- a todos que, embora não citados, con -  
tribuíram com sugestões, incentivo e trabalho.

## Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	6
2.1 - Preparação ciático poplíteo externo-tibial anterior de gato .....	6
2.2 - Preparação tibial anterior cronicamente desnervado de gato .....	7
2.3 - Preparação nervo frênico-diafragma isolado de rato .....	8
2.4 - Preparação diafragma desnervado de rato .....	10
2.5 - Preparação frênico-diafragma isolado de rato . Registro eletrofisiológico .....	11
2.6 - Ensaio da atividade enzimática .....	16
2.7 - Drogas e reagentes empregados .....	17
3. RESULTADOS .....	19
3.1 - Efeitos estimulante e bloqueador do McN sobre a preparação ciático poplíteo externo-tibial anterior de gato .....	19
3.2 - Contraturas induzidas pelo McN no músculo tibial anterior cronicamente desnervado de gato..	24
3.3 - Efeitos estimulante e bloqueador do McN sobre a preparação frênico-diafragma isolado de rato .....	30

3.4 - Contraturas induzidas pelo McN no diafragma cronicamente desnervado isolado de rato .....	30
3.5 - Atividade anticolinesterásica do McN .....	33
3.6 - Preparação frênico-diafragma de rato. Registro eletrofisiológico .....	35
3.6.1 - Efeito do McN sobre a frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura .....	35
3.6.2 - Efeito da TTX sobre o aumento da frequência dos mepps induzido pelo McN ..	37
3.6.3 - Efeito de pequenas doses de McN sobre a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura .....	41
3.6.4 - Medida do potencial de repouso da fibra muscular do diafragma isolado de rato .....	47
3.6.5 - Efeito da dTc sobre a redução do potencial de repouso produzida por doses elevadas de McN .....	53
4. DISCUSSÃO .....	58
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

## INTRODUÇÃO

Desde o trabalho inicial de ROSZKOWSKI (1961), o McN-A-343 (McN) ficou conhecido pela sua elevada potência em estimular receptores muscarínicos dos gânglios simpáticos. Esta ação é traduzida por acentuada e persistente hipertensão arterial, antagonizada por pequenas doses de atropina mas não pelos bloqueadores ganglionares convencionais tipo hexametônio. O mesmo autor assinalou ainda a ação contraturante do McN sobre o reto abdominal de rã. Contudo, como não tivesse conseguido produzir contração do músculo tibial anterior de gato pela injeção intra-arterial do composto, ROSZKOWSKI concluiu ser o McN praticamente desprovido de ação importante ao nível da placa motora. Por outro lado, CORRADO e cols. (1966) e SIMIONI e cols (1975), além de confirmarem os resultados de ROSZKOWSKI empregando o músculo reto abdominal de sapo observaram que, embora exibindo pequena atividade, o McN apresenta na preparação ciático-tibial anterior de gato e cão, uma discreta ação estimulante quando aplicado por via venosa nas doses de 50 a 200 mcg/kg. Constataram ainda que, ao aumentar a dose do composto, ele produz bloqueio da transmissão neuromuscular proporcional à concentração empregada.

É fato conhecido que a d-Tc é clássico

inibidor competitivo da ACh e de outras substâncias que atuam pelo mesmo mecanismo nos sítios colinoceptivos da placa motora. Contudo, embora também iniba os efeitos contratuantes do McN no reto anterior de sapo, o faz de modo não competitivo. Assim, as curvas dose-efeito do McN em presença de doses crescentes (0,1; 0,3; 1 e 3 mcg/ml) de d-Tc não produzem deslocamento, mas sim uma redução da amplitude da altura máxima das curvas proporcional à dose de inibidor empregada (SIMIONI e cols., 1975).

Este resultado inesperado, ou seja, o fato de a d-Tc atuar como inibidor não competitivo do McN, poderia ser explicado admitindo-se ação indireta por parte desse composto. Portanto, a ação estimulante do McN no reto anterior do sapo foi interpretada como sendo resultado de uma ação predominantemente pré-juncional que conduz à liberação do transmissor das terminações nervosas. A ação inibitória que se evidencia com grandes doses, seria devida a sua ação pré-juncional inespecífica, pois que nestas condições, bloqueia os efeitos da acetilcolina (ACh) sobre o reto anterior de modo não transponível (MURAYAMA, 1963; SIMIONI e cols., 1975). Esta ação inibitória em grandes doses seria responsável pelo perfil da curva dose-efeito caracte-

rístico do McN em forma de sino, associada, em geral, ao fenômeno de auto-inibição. Além disso, poderia explicar, embora não esclareça a sua natureza, o relaxamento observado em pombos não anestesiados logo após a morte em paralisia espástica, induzida pelo McN. Deve-se lembrar que esse relaxamento não se verifica com a administração de outros agentes despolarizantes como a succinilcolina, decametônio, neostigmina e outras substâncias que atuam apenas através de combinação com os receptores colinérgicos ou de inibição da acetilcolinesterase.

O fato de drogas como o carbacol (McKINS TRY e cols., 1963; MIYAMOTO e VOLLE, 1974), tetraetilamônio, bário (DOUGLAS e LYWOOD, 1961) e guanidina (HOFMANN e cols., 1966) exibirem a ação pré-juncional liberadora de ACh, apoia a possibilidade de o McN exercer ação estimulante da placa motora também através deste mecanismo. Em adição, podem ser citados venenos animais e suas toxinas - peçonha de Tityus serrulatus e tityustoxina (DINIZ e TORRES, 1968; VITAL BRAZIL e cols., 1973), crotoxina (VITAL BRAZIL e EXCELL, 1970), beta-bungarotoxina (LEE e CHANG, 1966), batracotoxina (ALBUQUERQUE e cols., 1971) - que apresentam também idêntica ação pré-juncional liberadora da ACh, embora

atuem por mecanismos distintos. Assim, a tetrodotoxina (TTX) inibe os efeitos da tityustoxina (PIMENTA, 1975) e da batracotoxina (ALBUQUERQUE, 1971), mas não interfere com o da crotoxina (VITAL BRAZIL e EXCELL, 1970). Além disso, tem sido demonstrado que o McN induz aumento da frequência de descarga dos potenciais espontâneos do gânglio mesentérico inferior de gato (MURYAMA, 1963).

Portanto, embora alguns estudos tenham sido feitos no sentido de esclarecer a natureza ou o modo de ação do McN na junção neuromuscular, até o presente, as evidências que existem não são ainda conclusivas sobre o seu mecanismo de ação nessa estrutura.

A presente investigação teve por objetivo testar a hipótese formulada por SIMIONI e cols. (1975) de que a ação estimulante do McN na placa motora, em pequenas doses, seja devida a uma liberação do neurotransmissor, e a de que, a ação inibidora exercida pelo McN resulte da despolarização prolongada da membrana pós-sináptica ao se combinar com os receptores colinérgicos. Neste sentido, foi feita inicialmente a análise miográfica dos efeitos do composto sobre o músculo tibial anterior de gato, o qual se comporta de modo peculiar frente às drogas despolarizantes da placa moto

ra. Além disso, foi usada a mesma preparação sob as formas inervada e cronicamente desnervada na determinação das curvas dose-efeito do McN e ACh, através de injeção intra-artérial para a avaliação da relação de potência dessas drogas nos dois tipos de preparação a fim de determinar a extensão do comportamento pré-sináptico dessas duas substâncias.

Estudaram-se as ações do McN também na preparação nervo frênico-músculo diafragma isolado de rato submetido ao registro miográfico e eletrofisiológico com o objetivo de esclarecer quais os componentes relevantes no mecanismo de ação do McN sobre a junção neuromuscular, ou seja, se o componente direto - colinomimético - ou se o componente indireto - colinérgico - aumentando a liberação de ACh.

Foi pesquisada ainda, uma possível atividade anticolinesterásica que representa uma ação a mais no conjunto das atividades exibidas pelo McN.

## MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Preparação ciático poplíteo externo-tibial anterior de gato.

Técnica:- Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (30 mg/kg e.v.) e preparados para o registro das contrações do músculo tibial anterior, estimulado indiretamente através do seu nervo motor. As respostas do músculo foram registradas em papel esfumado de quimógrafo Palmer. Aplicaram-se estímulos supramaximais de 2 mseg de duração e de frequência variável de 0,3 Hz (estímulos isolados) a 50 Hz (estímulos tetanizantes), fornecidos por estimulador eletrônico convencional Grass, Modelo S4, usando-se uma alavanca semi-isométrica para o registro das contrações musculares. No terço distal da pata, foi isolada a artéria tibial e canulada contra corrente para a aplicação intra-arterial do composto e da ACh, diretamente na massa muscular. (BROW, 1938) em alguns animais, registrou-se simultaneamente a pressão arterial através de cânula inserida na carótida ou femural e conectada a manômetro de mercúrio tipo Ludwig.

Método:- Procedeu-se à administração venosa de McN num intervalo de dose variando entre 250 a 4000 mcg/kg. Pela via intra-arterial o composto foi aplicado para produzir contração rápida. Valendo-se da mesma via, obteve-se a curva dose-resposta do McN e da ACh administrando-se doses crescentes de razão 2.

## 2.2 - Preparação tibial anterior cronicamente desnervado - de gato.

Técnica:- O músculo foi desnervado através de secção asséptica do seu nervo motor em animais sob anestesia pelo pentobarbital sódico (30 mg/kg e.v.) 15 dias antes da experiência. Registraram-se as contrações do tibial anterior por estimulação direta, por meio de dois eletrodos (agulha de platina) inserindo, um no corpo muscular e outro na transição músculo-tendínea. Empregou-se igualmente alavanca semi-geométrica para o registro das contrações e contraturas musculares. Foram usados os seguintes parâmetros estimulatórios: estímulo supramaximais

de 2 mseg de duração e frequência igual a 0,3 Hz. Em alguns casos registrou-se somente os efeitos contraturantes induzidos pela aplicação intra-arterial de ACh e McN. Em todos os casos registrou-se simultaneamente a pressão arterial, segundo técnica descrita na preparação anterior. No decorrer das experiências, as drogas foram injetadas pelas vias venosa (veia femoral) ou, contra corrente, na artéria tibial anterior homolateral ao músculo desnervado e canulada em direção central, a nível da articulação tíbio-társica.

Método:- Para a obtenção da curva dose-resposta, procedeu-se à administração de McN e ACh em concentrações crescentes de razão 2. A intervalos regulares era testada a responsividade da preparação ao McN com injeções de ACh de resposta previamente conhecida.

### 2.3 - Preparação nervo frênico-diafragma isolado de rato.

Técnica:- Foram usados ratos de 250 a

300 g de peso. Após anestesia dos animais pelo hidrato de cloral (240 mg/kg por via intraperitoneal) e sangria por secção dos vasos do pescoço, procedeu-se à retirada e montagem do segmento do hemidiafragma esquerdo com o nervo motor correspondente, de acordo com a técnica descrita por BULBRING (1946). Como meio nutritivo usou-se a solução de Tyrode glicosada com a seguinte composição: para 1 litro de água destilada 8,0 g NaCl; 0,20 g KCl; 0,20 g CaCl<sub>2</sub>; 0,10 g MgCl<sub>2</sub>; 0,0575 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 g glicose e 1 g NaHCO<sub>3</sub>. O volume da cuba foi de 50 ml e a sua temperatura mantida constante a 37°C. Oxigenou-se a preparação pelo borbulhamento de carbogênio (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) no banho. As contrações do hemidiafragma foram registrados em papel esfumado de quimógrafo Palmer através de pena inscritora de alavanca Starling. O nervo frênico foi colocado em eletrodos de platina e a estimulação, tanto do nervo frênico como do hemidiafragma foi feita com pulsos retangulares fornecidos por estimulador eletrônico (Grass, S4). Empregaram-se sempre estímulos maximais na excitação do nervo usando os seguintes parâmetros: frequência de 0,1 Hz, duração de 0,2 msec.

Método:- As drogas ensaiadas nesta preparação foram adicionadas ao banho num largo intervalo de dose, que variou entre 0,2 a 8 mcg/ml para a obtenção do bloqueio da transmissão neuromuscular.

#### 2.4 - Preparação diafragma desnervado de rato.

Técnica:- A desnervação foi feita pela secção do nervo frênico esquerdo, em ratos de 250 a 280 g, anestesiados pelo éter etílico segundo técnica descrita por VITAL BRAZIL (1965). Colocou-se o animal em decúbito lateral direito, fazendo-se uma incisão de 1,5 a 3 cm, perpendicular à linha mediana no terço inferior da região lateral do torax esquerdo previamente depilada. A incisão compreende a pele e a camada muscular delgada que recobre esta região. Ao longo de um espaço intercostal, em uma extensão de 1 a 2 cm, corta-se com tesoura os músculos intercostais. Usando-se bastão de vidro com extremidade recurvada, prende-se o nervo frênico na parede interna do torax tracionando-o para as bordas da incisão, onde é seccionado. Em seguida,

sutura-se apenas a pele por meio de dois ou três pontos - conforme a extensão da ferida. Decorridos 15 a 25 dias, retira-se o segmento em leque do hemidiafragma esquerdo e monta-se a preparação, segundo técnica adotada no caso anterior, para solução nutritiva, volume e temperatura do banho, assim como o processo de registro das contrações. Procedeu-se à excitação elétrica do diafragma desnervado com pulsos de 2 msec de duração, 0,1 Hz de frequência e 50-100 volts de intensidade, por períodos, em geral, de cinco minutos.

Método:- As contraturas da preparação - pelo McN foram obtidas usando-se concentrações de 25-400 mcg/ml. A curva dose-efeito para o McN foi obtida usando - se escala de doses compreendidas entre 25 a 100 mcg/ml em presença ou ausência da dTc.

## 2.5 - Preparação frênico-diafragma isolado de rato. Regis- tro eletrofisiológico

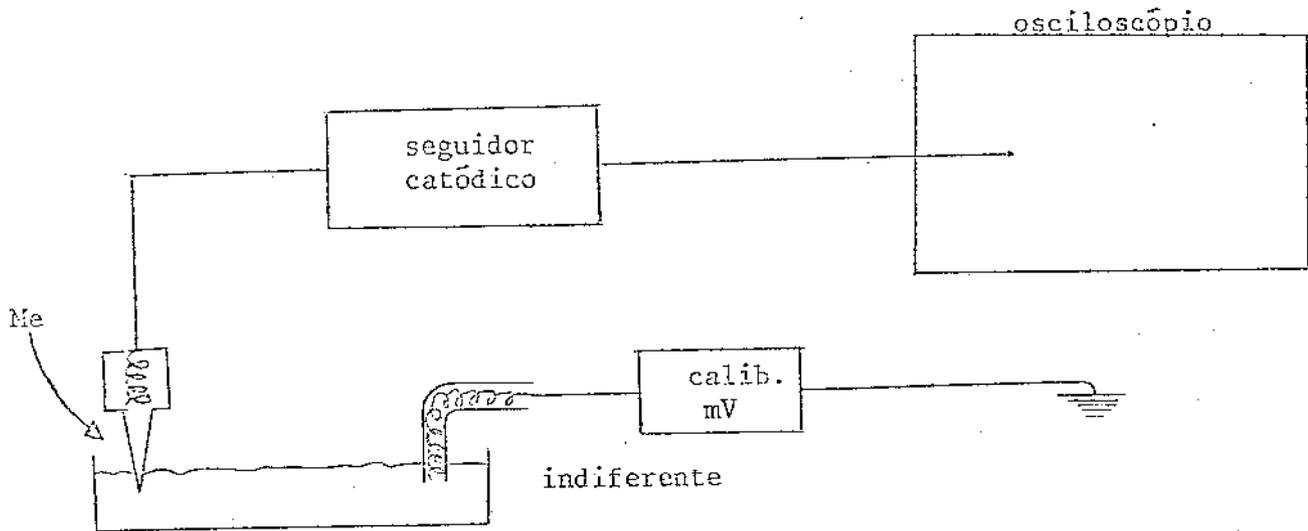
Técnica: - Utilizaram-se ratos de 250 a 300 g cujo hemidiafragma esquerdo foi retirado com um segmento do nervo frênico correspondente, segundo técnica já descrita. O músculo era estendido e fixado com sua face torácica voltada para cima no fundo de uma cuba de perspex com 10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 2 cm de profundidade através de alfinetes apropriados. A cuba era preenchida com 50 ml de solução nutritiva Tyrode glicosado de composição como a citada para a preparação do ítem 2.3. A oxigenação da preparação foi feita pelo borbulhamento de carbogênio. O banho foi mantido à temperatura ambiente (25°C). Os potenciais bioelétricos de fibras musculares isoladas eram captados através de microeletrodos (Me) de vidro preenchidos com solução de KCl 3M e de resistência compreendida entre 5-12 MΩ. Eram preparados semanalmente no próprio laboratório e conservados em geladeira. Para sua confecção utilizaram-se túbulos de vidro apropriado e um esticador de microeletrodos CFP, modelo 8104.

Descrição sumária do circuito: - Os Me entravam em contato, por sua extremidade posterior, com um filamento em espiral de prata cloretada contido no inte -

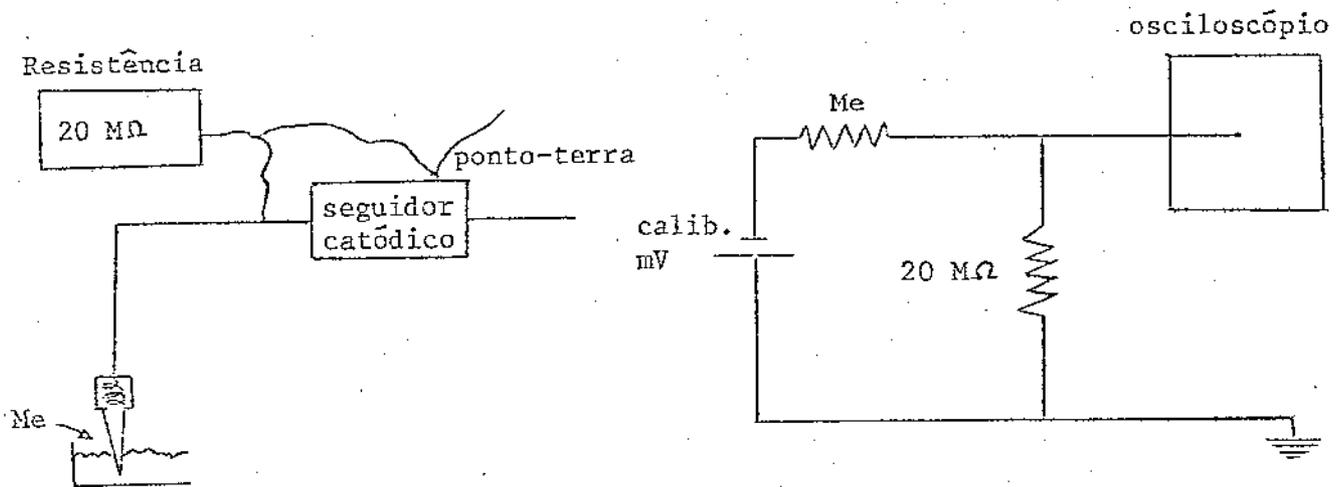
rior de um pequeno tubo de vidro (2 cm de comprimento) preenchido com agar. Encaixavam-se em uma das extremidades - desse tubo, saindo pela outra um fio condutor que unia o filamento de prata a um seguidor catódico. O pequeno tubo de vidro era sustentado pelo braço de um micromanipulador Jena acoplado ao microscópio binocular de dissecação Zeiss, para aumentos de até 40 vezes. Este equipamento permitia - realizar pequenos deslocamentos verticais ou horizontais - controlando o Me microscopicamente. O seguidor catódico estava posicionado próximo ao braço do micromanipulador e conectava-se ao dois canais de um osciloscópio Tektronix, modelo 502-A. O eletrodo indiferente, constituído por um fio espiralado de prata cloretada contido em um tubo de vidro curvo preenchido com agar, mantinha-se mergulado no líquido nutritivo. Estava ligado por meio de um fio condutor a um gerador de impulsos capaz de fornecer sinais de 100, 20, 5, 1 e 0,2 mV. A preparação de toda a aparelhagem empregada, exceto o osciloscópio, eram mantidos no interior de uma gaiola de Faraday montada sobre uma mesa rígida de cimento fixada ao solo a fim de evitar vibrações. O circuito descrito, que está esquematizado em forma simplificada na Fig. 1, foi preconizado por EXCELL (1970), em cujo tra

balho poderá ser encontrado maiores detalhes sobre as características dos aparelhos utilizados.

Método:- Após ser retirado de seu suporte de estocagem o Me era encaixado no pequeno tubo de vidro que continha o filamento de prata cloretada. Fixava-se o conjunto no braço do micromanipulador, ligando-se o fio condutor no seguidor catódico. Procedia-se, então, à medida da resistência do Me mergulhando-o na solução nutritiva introduzindo em paralelo no circuito uma resistência de valor conhecido: 20 M (Fig. 1). Eram desprezados os Me cujas resistências não estavam compreendidas entre 5-25 M $\Omega$ . A determinação do potencial de membrana (PM) das fibras musculares era feita sob controle microscópico, inserindo-se o Me no interior de uma fibra muscular e medindo-se o deslocamento vertical sofrido pelo canal superior do osciloscópio no momento de penetração. Repetia-se o mesmo procedimento em dez pontos distintos do músculo e calculava-se a média aritmética das 10 leituras realizadas. O PM era determinado multiplicando-se o valor da média por um fator de correção. Este era estabelecido introduzindo-se no circuito um sinal de 100 mV e medindo-se a deflexão correspondente ao osciloscó-



A - Circuito Simplificado



B - Circuito simplificado para a obtenção da resistência do Me.

C - Circuito para medida da resistência do Me.

Figura 1 - Esquema do circuito para registro eletrofisiológicos dos potenciais em miniatura da placa motora terminal de diafragmas isolados de ratos.

pio. Em sete experiências o McN foi posto em contato com a preparação na concentração de 0,1 a 1,0 mcg/ml por período de até 120 minutos. Os efeitos observados no osciloscópio eram registrados através de máquina fotográfica Polaroid, modelo 3, acoplada ao osciloscópio. Para a medida da frequência dos mepps, foram fotografadas consecutivamente 20 varreduras usando-se no osciloscópio velocidade de 10 mseg/cm em condições normais, em presença do McN e após a lavagem e recuperação da preparação. O número de potenciais foi lançado em gráficos, colocando-se nas ordenadas a frequência dos potenciais e em abcissas o tratamento usado. A amplitude dos mepps foi registrada durante quatro minutos e medida a altura de cada potencial, tornando-se o centro do ruído como linha base. A distribuição de frequência das duas distribuições antes e após o McN. Este composto foi ensaiado também no intervalo de doses variando entre 2 a 50 mcg/ml. Após a adição da substância ao banho, eram feitas as medidas do potencial de membrana na região das placas terminais através de procedimento já descrito. Em três experiências a TTX foi adicionada à solução nutritiva na dose de 0,2-0,5 mcg/ml. Nesta concentração a TTX promoveu, após 30-90 minutos, bloqueio das respostas do diafragma à

excitação elétrica do seu nervo motor. Nestas condições em que a descarga dos potenciais espontâneos permanece inalterada, adicionava-se McN (0,1-0,2 mcg/ml), observando-se os resultados num período entre 1 a 30 minutos. Os efeitos foram registrados, em geral, no 3º, 15º e 30º minutos, através de máquina fotográfica Polaroid acoplada ao osciloscópio.

#### 2.6 - Ensaio da atividade enzimática.

A acetilcolinesterase utilizada, foi extraída de membrana de eritrócito de cobaia. O sangue, obtido por punção cardíaca em presença de heparina, foi centrifugado, removendo-se o plasma e as hemácias sendo submetidas a choque osmótico. Em seguida, foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Sorval RC<sub>2</sub>) a 15.000 rpm por 30 minutos. As membranas das hemácias foram resuspensas em solução 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl<sub>2</sub>. A atividade enzimática foi medida pelo método titulométrico de dosagem do ácido acético liberado, usando-se pH-Stat Radiometer TTT<sub>1</sub>.

acoplado a um registrado que indica as quantidades de hidróxidos de sódio automaticamente gastas para manter constante o pH. O meio de incubação continha 0,1 M de NaCl ; 0,02 M de MgCl<sub>2</sub> e  $2,6 \cdot 10^{-4}$  M de ACh. O pH foi ajustado para 7,1 e a temperatura era 25°C. O inibidor (McN) foi diluído para uma solução de concentração igual a 0,1 M em 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl<sub>2</sub> e preencubado com a preparação enzimática, durante 5 minutos, a 0°C. A concentração de hidróxido de sódio utilizada foi de 0,0001 M (TERRONE e cols. 1972).

#### 2.7 - Drogas e reagentes empregados.

1. Iodeto de acetilcolina "Sigma" P.M. do sal 273,1 g.
2. Cloreto de d-Tubocurarina "Abbott" P.M. do sal 695,7 g.
3. Neostigmina (Prostigmina) "Roche".
4. Pentobarbital sódico ( Nembutal ) , "Abbott".

5. McN-A-343 (Cloreto de 4-(m-fenilcarbamoil-oxi)-2-butinil trimetilamônio) P.M. do sal -  
317,00 g (\*).

6. Hidrato de cloral.

7. Tetrodotoxina Sankyo Co P.M. do sal  
319 g (\*\*).

- a) Cloreto de sódio (NaCl) "Merck"
- b) Cloreto de potássio (KCl) "Baker"
- c) Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) "Baker"
- d) Fosfato monobásico de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) "Baker"
- e) Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) "Carlo Erba"
- f) Glicose "Reagen"

---

( \*) Gentilmente enviado pelo Dr. P. Roszkowisly. Department of Pharmacology, Research Division, Mc Neil Laboratories, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.

(\*\*) Gentilmente cedida pela Dra. Barbara Excell Howgood . Department of Physiology, Queen Elizabeth College , London.

RESULTADOS

3.1 - Efeitos estimulante e bloqueador do McN sobre a preparação ciático poplíteo externo-tibial anterior de gato:

O registro simultâneo do miograma deste músculo e da pressão arterial possibilitou demonstrar que, pela via venosa, o McN, da mesma forma que a ACh, é pouco ativo na junção neuromuscular embora provoque efeitos cardiovasculares evidentes. Assim, o composto em estudo induz o aparecimento dos seus primeiros efeitos neuromusculares somente a partir de doses iguais ou superiores a 250 mcg/kg, mais do que suficientes para desencadear o seu característico efeito bifásico na pressão arterial. Doses de McN, variáveis de 250 a 500 mcg/kg, determinam o aparecimento de discreto porém prolongado aumento da amplitude das contrações do músculo tibial anterior e doses superiores a 500 mcg/kg causam inibição progressiva da transmissão sináptica cujo bloqueio completo é obtido com a administração de elevadas doses variáveis, de preparação para preparação, entre 2 a 4 mg/kg (Fig. 2). Na vigência destas últimas doses, ocasionalmente é possível observar-se, precedendo o bloqueio

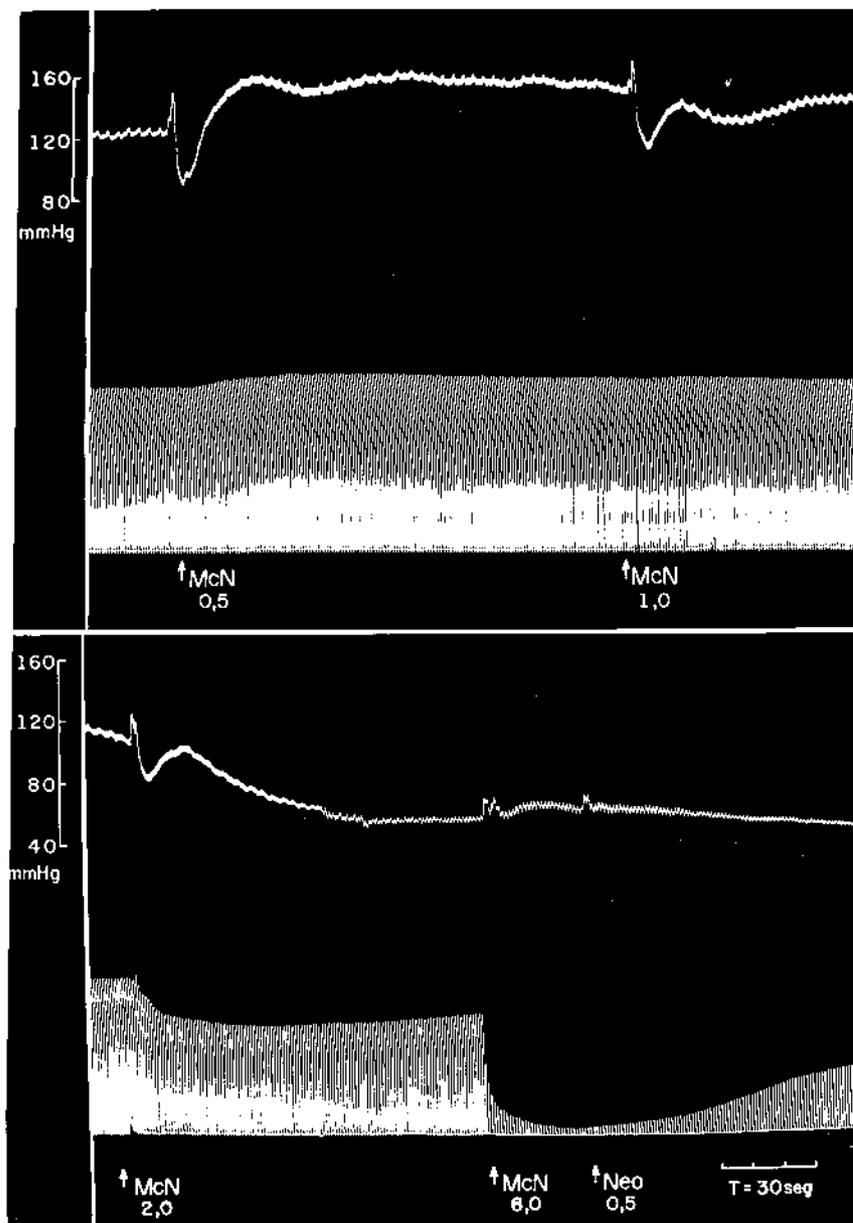


Figura 2 - Registro simultâneo da pressão arterial carotídea e do mio-  
grama do músculo tibial anterior de gato (2,0 kg) anestesia  
do pelo pentobarbital sódico (30 mg/kg i.p.). Estímulos su-  
pramaximais de 2 mseg de duração e de frequência

0,3 Hz, foram aplicados ao nervo ciático poplíteo externo. Todas as injeções foram feitas pela via venosa; os números indicam o total de mg injetados. Notar: 1º) o discreto porém prolongado aumento da amplitude das contrações do músculo às menores doses de McN; 2º) o bloqueio neuromuscular após doses sensivelmente maiores; 3º) o breve estímulo da preparação que precede o bloqueio neuromuscular parcial após a aplicação de 1,0 mg/kg (dose total 2,0 mg) de McN; 4º) a reversão parcial do bloqueio pela neostigmina (Neo 0,25 mg/kg); 5º) a progressiva queda dos níveis da pressão arterial e das respostas hipertensoras desencadeadas pelo McN.

neuromuscular, estimulação fugaz da preparação, análoga à descrita para o decametônio e succinilcolina (Fig. 2). A sucessiva aplicação dessas elevadas doses proporciona também a instalação de um bloqueio passível de ser antagonizado pela neostigmina (250 a 500 mcg/kg pela via venosa), bem como uma queda progressiva dos níveis da pressão arterial e dos efeitos hipertensores provocados pelo McN (Fig. 2).

Os acentuados efeitos cardiovasculares limitaram o estudo desse composto pela via venosa a qual foi substituída pela via arterial, através da injeção contra-corrente na artéria que irriga o tibial anterior. Através deste procedimento, foi possível registrar o "twitch", ou seja, o abalo muscular simples que, provocado pelo McN, segue o mesmo padrão da ACh (Fig. 3), embora o composto tenha se revelado muito menos ativo quando comparado ao mediador colinérgico, como veremos mais adiante (Fig. 6). O "twitch" desencadeado pelo McN é seguido de bloqueio da transmissão sináptica de características análogas ao induzido pelo decametônio e succinilcolina, ou seja, esse bloqueio é rápida e espontaneamente reversível e, na sua vigência, verifica-se que a contração tetânica continua man-

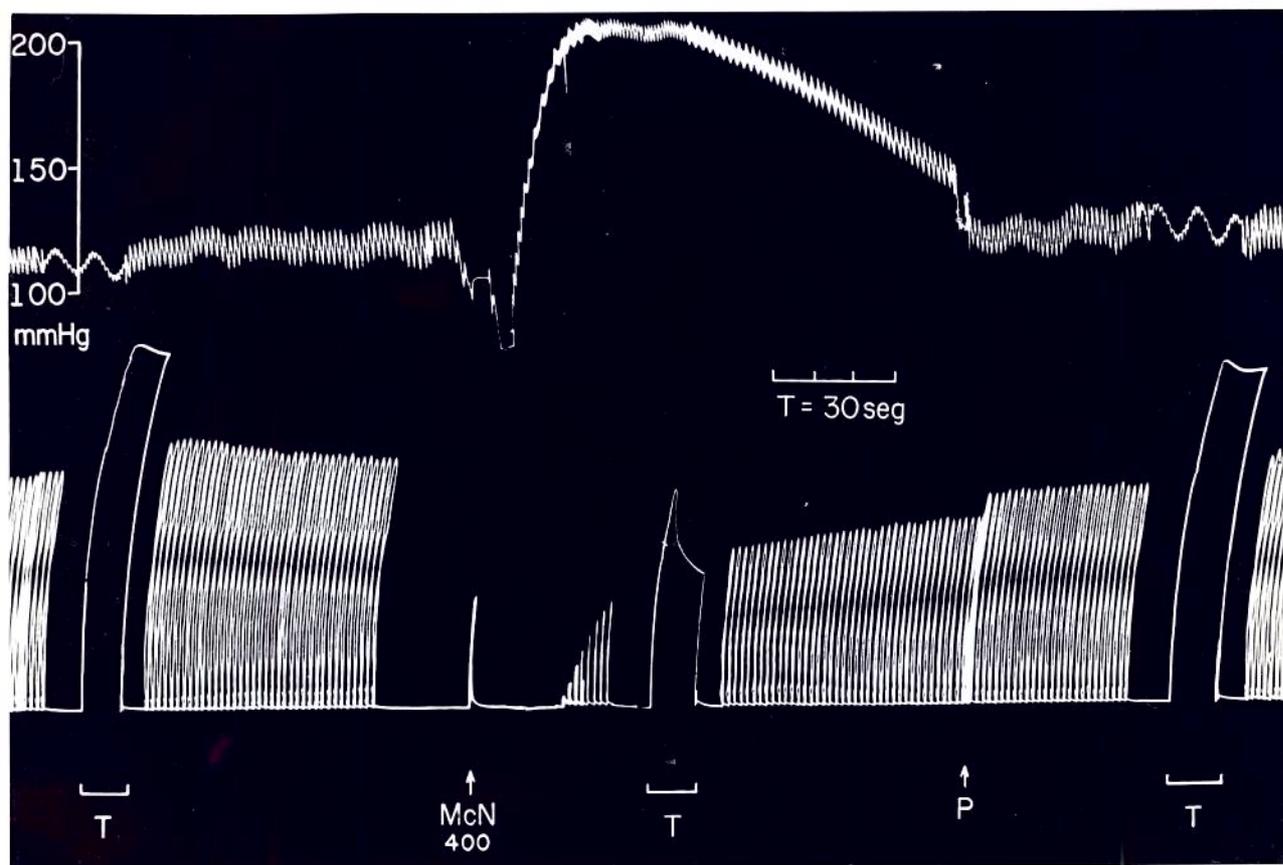


Figura 3 - Registros como indicados da Fig. 2. Gato (2,8 kg) anestesiado pelo pentobarbital sódico (30 mg/kg i.p.). Em T, estímulo tetânico (50 Hz) pelo período de 10 seg durante o qual foi aumentada a velocidade do quimógrafo. Em P, parada de 5 minutos. Notar: 1º) que são requeridas elevadas concentrações de McN (400 mcg - dose única - diretamente na artéria que irriga o músculo) para o desencadeamento do "twitch" que é seguido de bloqueio da preparação; 2º) a queda da amplitude da contração tetânica - embora mantida - ao nível da inibição neuromuscular; 3º) a espontânea reversibilidade do bloqueio neuromuscular; 4º) o conhecido efeito bifásico do composto na pressão arterial.

tida, embora de amplitude menor e cuja magnitude é diretamente proporcional ao grau de inibição neuromuscular ( Fig. 3).

Embora a obtenção de curvas dose-efeito à ACh nesta preparação se afigure tarefa relativamente fácil, o mesmo não se poderá dizer com relação ao McN, pela grande variabilidade da sensibilidade das preparações neuromusculares ao composto em estudo, pelo seu efeito cumulativo e sobretudo porque, frequentemente, logo após o primeiro ou segundo "twitch", o McN desencadeia o aparecimento de fasciculações que, obviamente, interferem indiretamente nas curvas quantitativas, prejudicando 5 dos 10 experimentos realizados para essa finalidade (Fig. 4). Por outro lado, a análise dos experimentos considerados quantitativamente válidos mostrou a evidente menor sensibilidade do McN em relação à ACh, como poderá ser comprovado na Fig. 6, que correlaciona as curvas dose-efeito dos dois agonistas, em ambas preparações inervadas e desnervadas.

### 3.2 - Contraturas induzidas pelo McN no músculo tibial anterior cronicamente desnervado de gato:

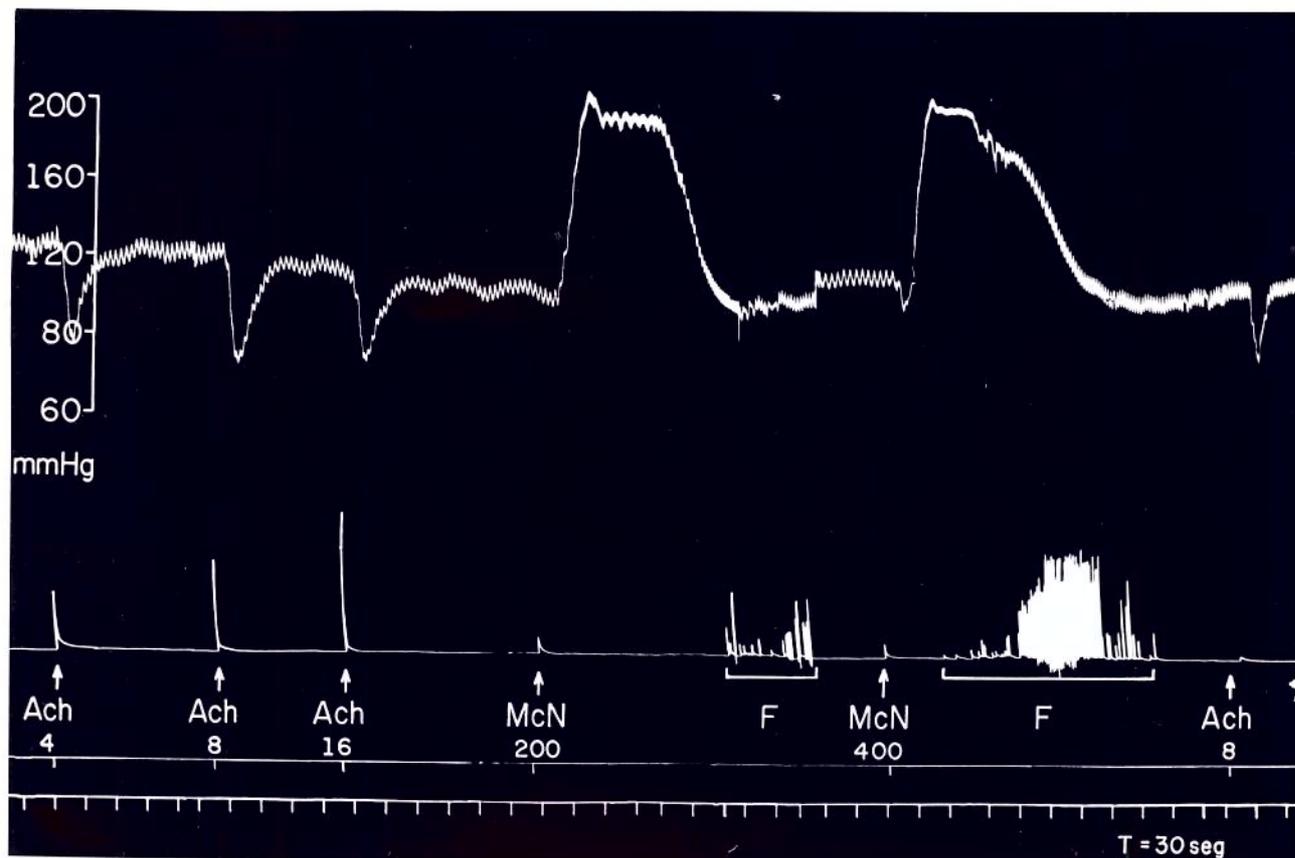


Figura 4 - Registro simultâneo da pressão arterial carotídea e de abalos musculares simples ("twitches") do músculo tibial anterior de gato (2,2 kg) anestesiado pelo pentobarbital sódico (30 mg/kg i.p.). Notar: 1º) a curva dose-efeito da ACh pela sucessiva aplicação de 4, 8 e 16 microgramas diretamente na artéria que irriga o músculo; 2º) o aparecimento de fasciculações (F), logo após a injeção de 200 e 400 mcg de McN pela mesma via, responsáveis pelo bloqueio dos efeitos da maior dose de McN e da própria ACh; 3º) o característico efeito bifásico do McN na pressão arterial.

As Figs. 5A e 5B apresentam um experimento tipo, entre seis de resultados análogos, que confirma a conhecida supersensibilidade dos músculos desnervados à ACh, o mesmo observando-se com relação ao McN, porém este em nível sensivelmente inferior, como pode-se facilmente deprender da análise das curvas dose-resposta da Fig. 6. Ao contrário das preparações inervadas, este efeito contraturante do McN foi sistematicamente observado, obtendo-se as curvas dose-efeito em todos os experimentos realizados. Após a aplicação das menores doses do composto, ocorre uma potencialização das respostas do músculo à ACh (Fig. 5A), observando-se o contrário após as maiores doses de McN que além de desencadearem a conhecida curva em sino de alto-inibição, bloqueiam também os efeitos contraturantes da ACh (Fig. 5B). Embora mais ativo em induzir contraturas do que "twitches", uma vez mais evidenciou-se a diferença de sensibilidade entre as sinapses ganglionar e neuromuscular ao McN pois os efeitos cardiovasculares são mais pronunciados comparados precederam aos musculares. Verificou-se, outrossim, uma diferença qualitativa entre as respostas das sinapses ganglionar e neuromuscular, pois a dTc potencializou amplamente a hipertensão porém bloqueou totalmente a contratu

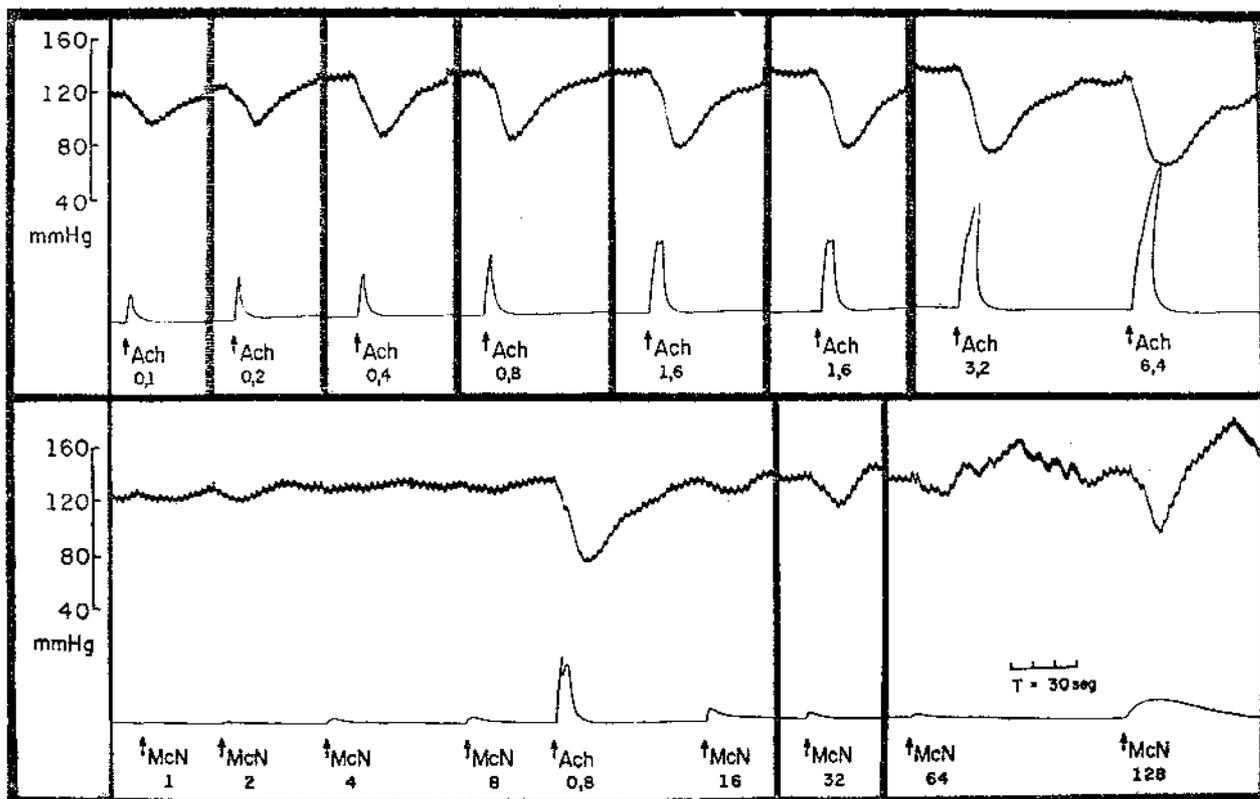


Figura 5A - Registro simultâneo da pressão arterial carotídea e dos efeitos contraturantes induzidos pela ACh e pelo McN no músculo tibial anterior cronicamente (15 dias) desnervado de gato (2,0 kg) anestesiado pelo pentobarbital sódico (30 mg/kg i.p.). Curvas dose-resposta à ACh e ao McN diretamente aplicados na artéria que irriga o músculo. Os números indicam o total de mcgs injetados em cada aplicação intra-arterial. Notar: 1º) a nítida diferença de atividade entre os dois agonistas; 2º) a potencialização dos efeitos contraturantes da ACh após as menores doses de McN.

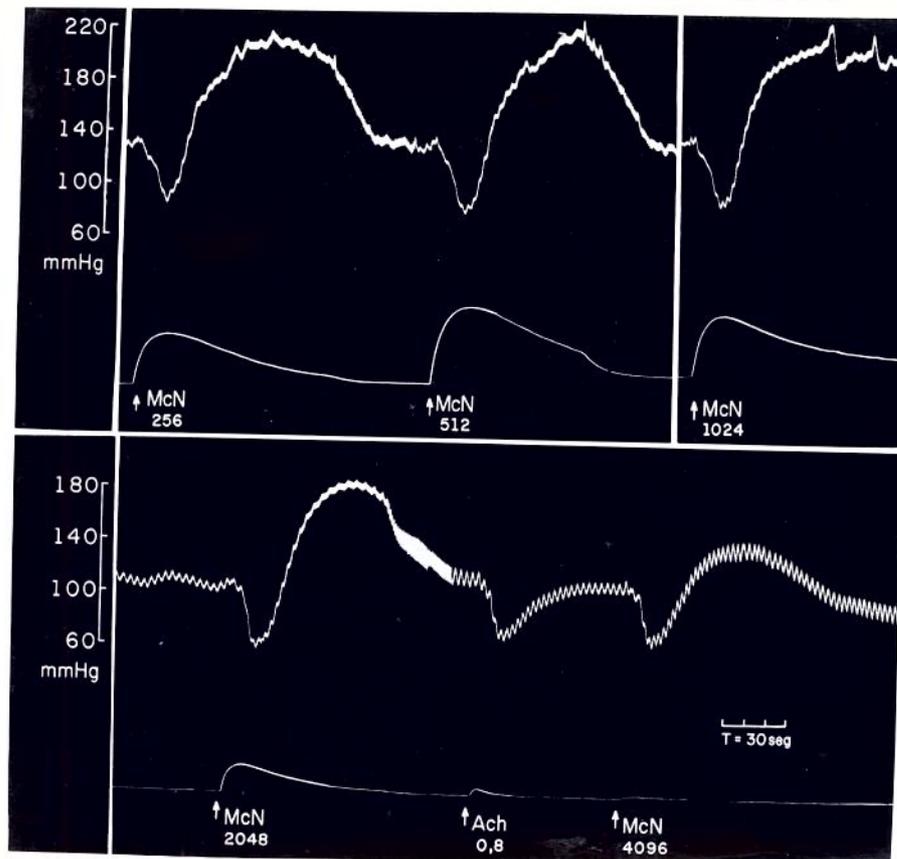


Figura 5B - Continuação da experiência ilustrada na Fig. 5A. Notar: 1º) a curva de auto-inibição do McN; 2º) o bloqueio dos efeitos da acetilcolina após as maiores doses do composto; 3º) a progressiva queda dos níveis da pressão arterial e das respostas hipertensoras do McN.

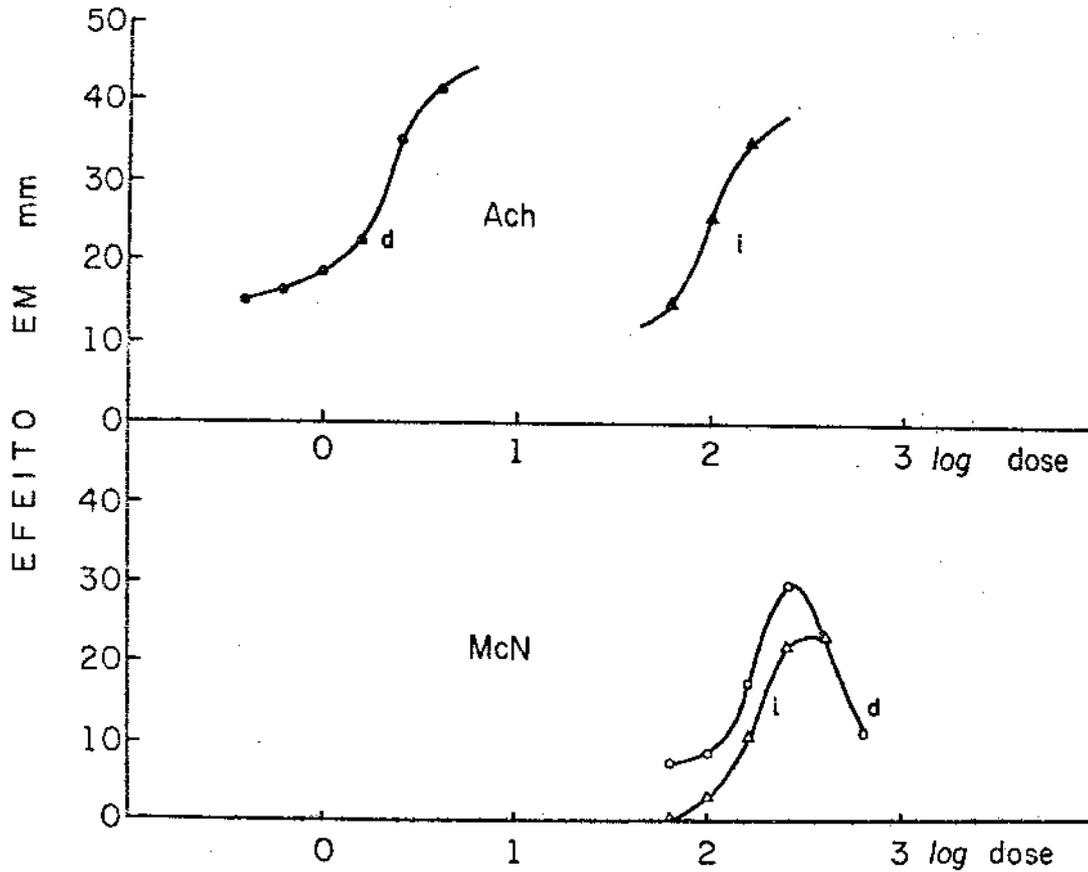


Figura 6 - Curvas dose-resposta à ACh e ao McN injetados diretamente na artéria que irriga o músculo tibial anterior inervado (i) ou cronicamente (15 dias) desnervado (d). Cada ponto corresponde à média de 3 experiências. Notar o pronunciado afastamento dessas curvas com relação à ACh, ao contrário do discreto afastamento observado com o McN. Com este último é visível também a conhecida curva de auto-inibição, em sino, facilmente obtida em músculo desnervado.

ra induzidas pelo McN (Fig. 7).

3.3 - Efeitos estimulante e bloqueador do McN sobre a preparação frênico-diafragma isolado de rato:

Os registros miográficos desta preparação, em presença do McN, confirmam os resultados obtidos na preparação ciático poplíteo externo-tibial anterior de gato, pois o composto reproduziu o discreto porém prolongado aumento da amplitude de contração ao ser aplicado em pequenas concentrações (da ordem de 0,25 a 1 mcg/ml no banho) e bloqueio neuromuscular progressivo do diafragma com a adição ao banho de doses sucessivamente maiores ( de 2 a 8 mcg/ml) (Fig. 8).

3.4 - Contraturas induzidas pelo McN no diafragma cronicamente desnervado isolado de rato:

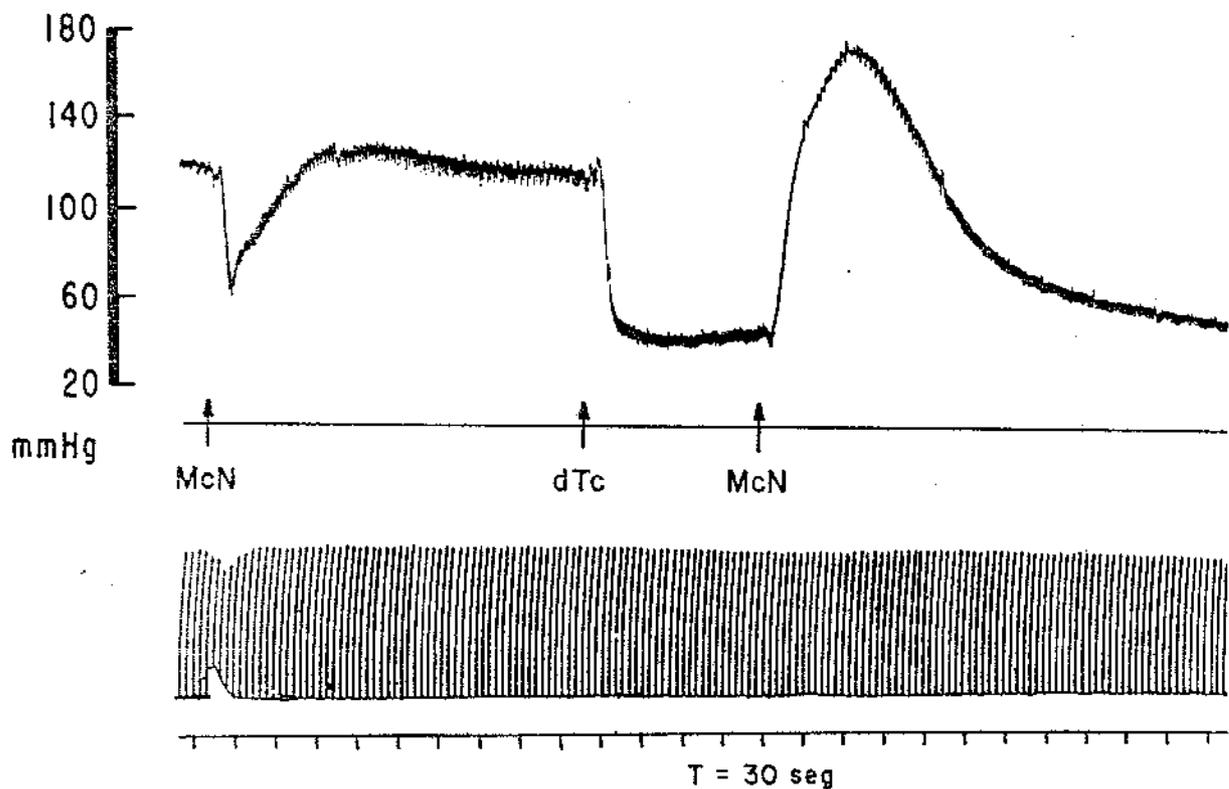


Figura 7 - Registro simultâneo da pressão arterial carotídea e das contrações do músculo tibial anterior cronicamente (15 dias ) desnervado de gato (1,9 kg) anestesiado pelo pentobarbital sódico (30 mg/kg i.p.). Preparação submetida a estímulos supramáximos de 2 msg de duração e 0,3 Hz, de frequência. Notar que a dTc (0,1 mg/kg e.v.) bloqueou totalmente a contratura induzida pelo McN (50 mcg dose total diretamente na artéria que irriga o músculo) e, pelo contrário, potencializou amplamente o efeito hipertensor do composto.

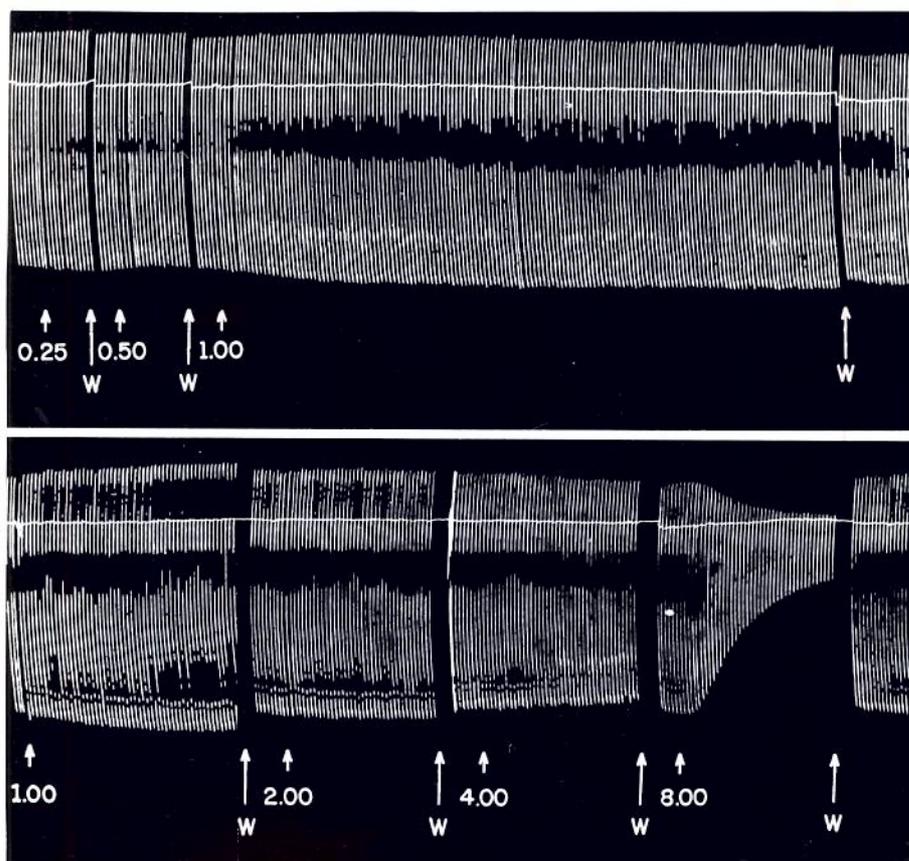


Figura 8 - Registro miográfico de diafragma isolado de rato estimulado através do seu nervo motor. Preparação imersa em Tyrode-glicose a 37°C e sob constante borbulhamento fino de mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Estímulos supramáximos - de 0,2 msg de duração e 0,1 Hz de frequência. Notar o discreto porém progressivo aumento da amplitude da contração do músculo, com as menores doses de McN, seguido de progressivo bloqueio após a aplicação das maiores doses. Os números indicam as concentrações - em mcg/ml - de McN aplicadas ao banho. Em W - a preparação foi submetida a 3 lavagens.

De maneira análoga à observada no tibial anterior desnervado de gato, o McN (25, 50 e 100 mcg/ml), provoca contraturas do diafragma desnervado, também amplamente inibidas pela adição prévia ao banho de dTc para uma concentração final de 1 mcg/ml (Fig. 9).

### 3.5 - Atividade anticolinesterásica do McN:

Com base nas características estruturais do composto, onde se nota a presença de uma ligação carbâmica (pg. 58), bem como, na referida potencialização que o mesmo provoca quando aplicado em pequenas doses, aos efeitos musculares da ACh (Fig. 5A), procurou-se evidenciar uma eventual ação anticolinesterásica do McN. Esta sugestão foi comprovada pela aplicação do método enzimático da medida da atividade anticolinesterásica, segundo técnica convencional. Foram usadas quatro concentrações do composto, ou seja, de  $10^{-4}$  a  $5 \cdot 10^{-4}$  M e, observou-se que a concentração de McN capaz de reduzir em 50% a velocidade de hidrólise da acetilcolina foi da ordem  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M ( Fig.

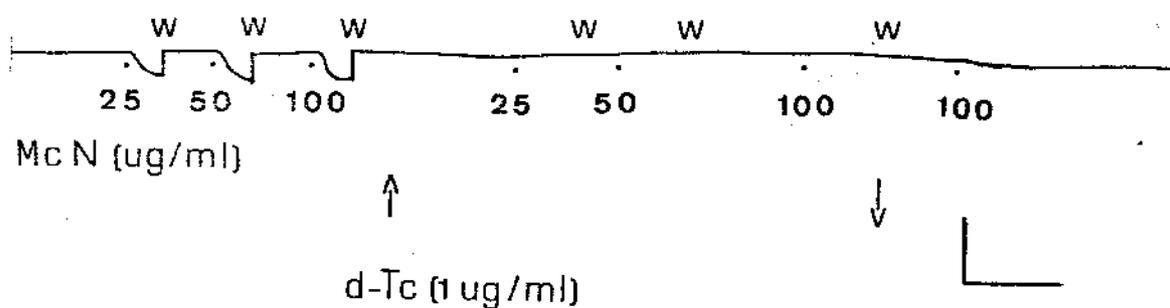


Figura 9 - Efeitos contraturantes provocados pelo McN no diafragma cro nicamente desnervado isolado de rato. Preparação imersa em líquido nutritivo como indicado na Fig. 8. Notar que as con traturas provocadas pela adição ao banho de McN (25, 50 e 100 mcg/ml) são totalmente bloqueadas pela dTc na concentra ção de 1 mcg/ml. Barra vertical - 1 cm; barra horizontal 7,5 minutos; W - lavagem da preparação.

10). Esse resultado classifica o composto no grupo de anti colinesterásicos pouco ativos, pois quando comparado à neostigmina se mostra cerca de mil vezes menos potente.

### 3.6 - Preparação nervo frênico-diafragma de rato. Registro eletrofisiológico:

O registro eletrofisiológico dos potenciais de placa terminal em miniatura (m.e.p.ps.) possibilita o emprego de pequenas concentrações de McN, algumas inefetivas para alterar o traçado miográfico.

#### 3.6.1 - Efeito do McN sobre a frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura:

O McN, em concentrações variáveis de 0,1 a 1 mcg/ml, causa, sistematicamente, um aumento na frequência dos mepps, ao mesmo tempo que o potencial de repouso mantém-se inalterado.

Em seis experiências, após o controle da

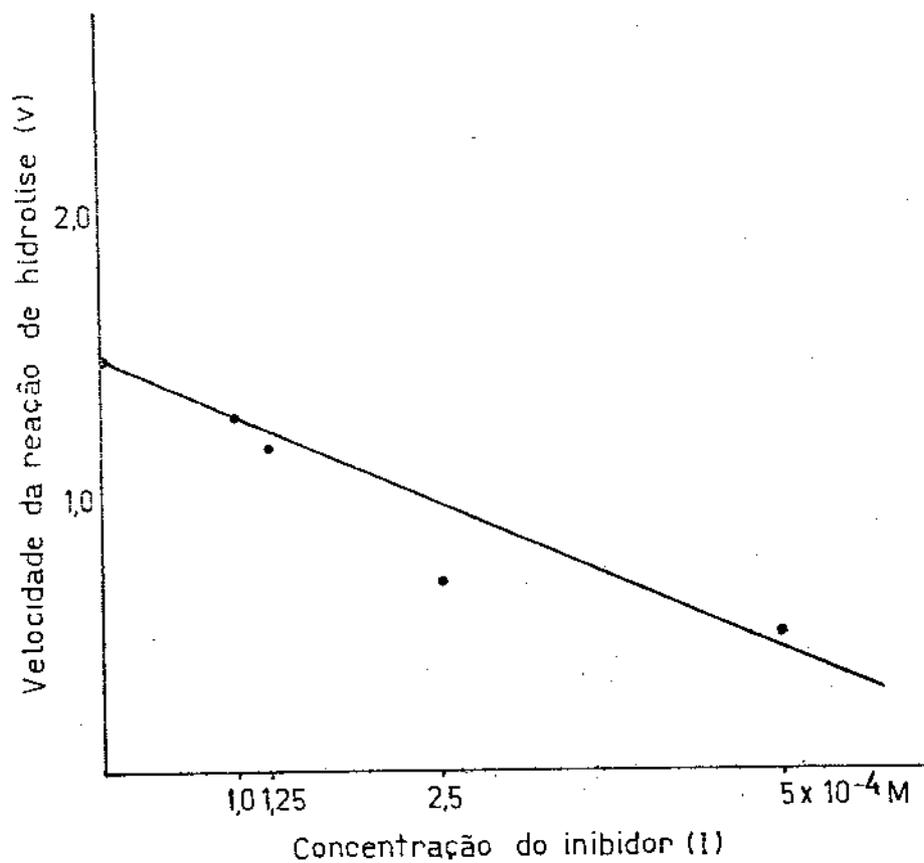


Figura 10 - Curva da atividade anticolinesterásica do McN. A concentração deste inibidor (i) capaz de reduzir de 50% a velocidade de hidrólise da ACh (v) foi da ordem de  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ .

frequência basal, adicionou-se à cuba o composto em estudo e observou-se o aparecimento da descarga dos mepps a partir de 3 minutos de contato entre o músculo e a droga (Fig. 11). Tal efeito se prolongou por período superior a 60 minutos. O progressivo aumento da concentração do McN - para doses superiores a 2 mcg/ml provoca a diminuição da frequência e amplitude dos mepps até o seu desaparecimento.

A Fig. 12 ilustra o marcante aumento da frequência dos mepps após a aplicação de McN (0,1 a 1,0 mcg/ml) e a correspondente volta ao estado inicial controle, após lavagens sucessivas.

### 3.6.2 - Efeito da TTX sobre o aumento da frequência dos mepps induzido pelo McN:

Em três experiências, o músculo diafragma de rato permaneceu imerso em solução nutritiva contendo 0,2 a 0,5 mcg/ml de TTX por tempo suficiente para que se estabelecesse bloqueio da transmissão neuromuscular, comprovado pelo bloqueio da estimulação elétrica indireta da preparação. Como era esperado, os potenciais de placa ter-

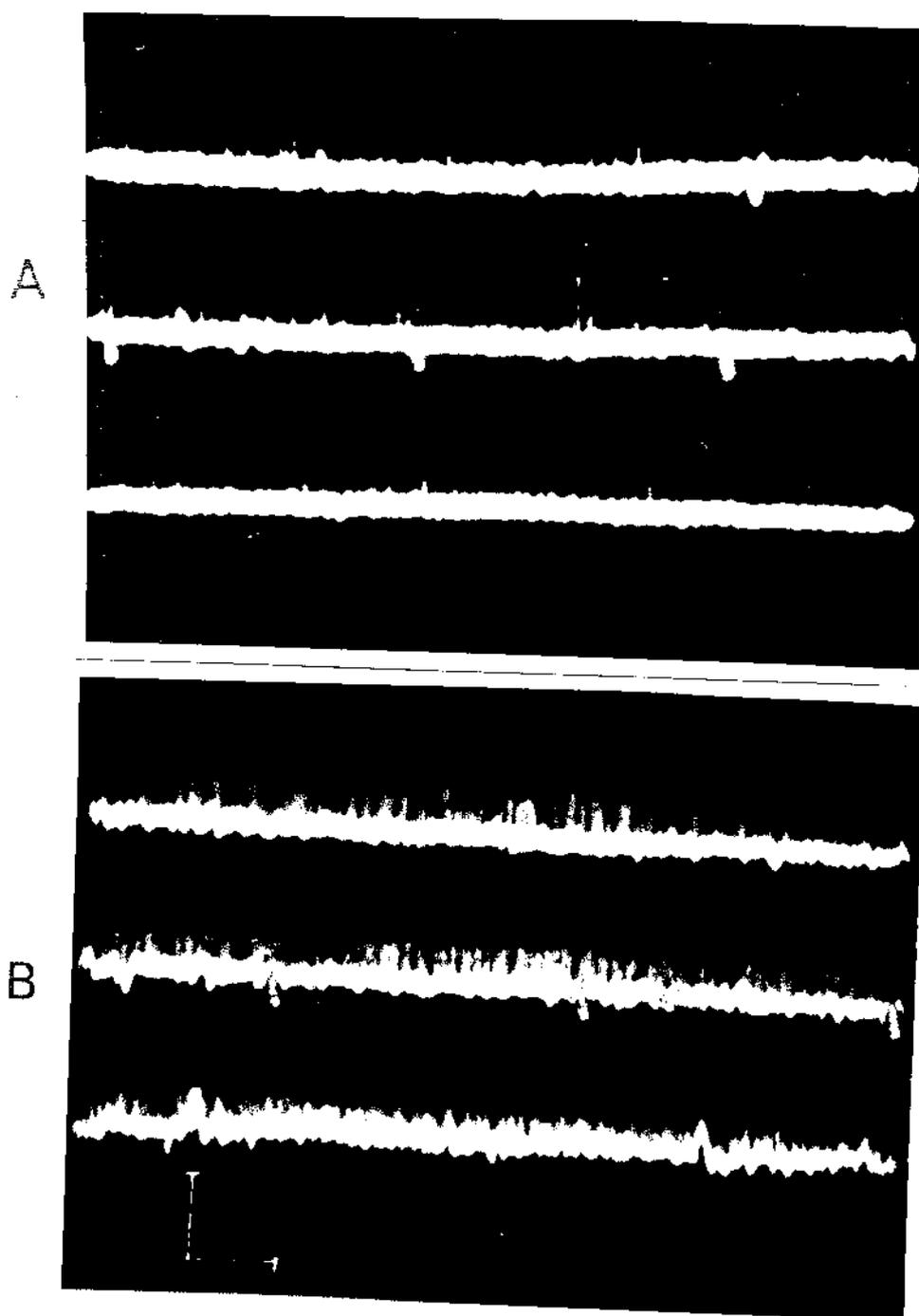


Figura 11 - Registro dos potenciais de placa terminal em miniatura (mepp) em diafragma isolado de rato. Em A, registro contro

le; em B, 3 a 5 minutos após a adição de McN (0,1 mcg/ml).  
Sensibilidade - 0,2 mV (barra vertical). Velocidade - 2  
seg. (barra horizontal). Notar o marcante aumento da fre-  
quência dos mepps.

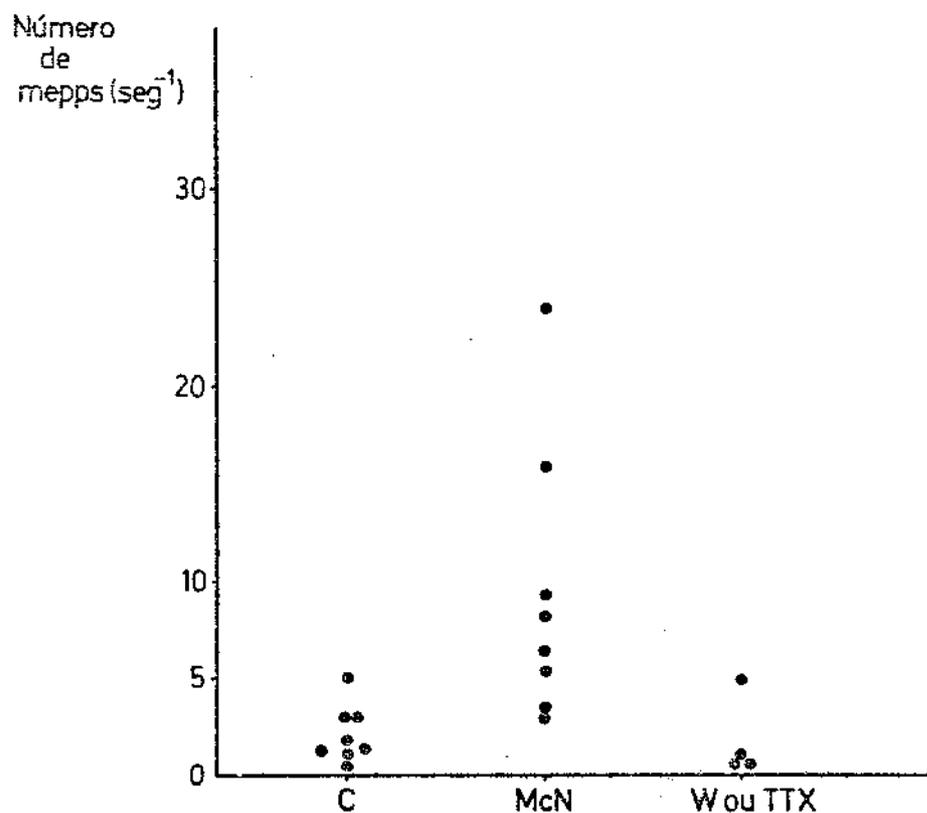


Figura 12 - Representação gráfica da frequência dos potenciais em miniatura da placa terminal. Cada ponto representa o registro dos potenciais de uma fibra muscular. Em C, tem-se a frequência controle; em McN, após a adição de McN (0,1 a 1 mcg/ml). W e TTX indicam lavagem (W) ou adição de TTX (0,2 mcg/ml). Notar o aumento da frequência dos mepps após o McN e seu correspondente bloqueio ou volta à frequência controle após a TTX ou lavagem.

minal em miniatura mantiveram-se presentes após o tratamento das preparações com essa toxina (KATZ, 1972). Ao se adicionar McN, no intervalo de doses de 0,1 a 1,0 mcg/ml, não só não se observou o habitual aumento da frequência dos mepps, como também determinou a diminuição progressiva dos mepps até o seu desaparecimento. Este efeito da TTX se faz presente tanto mais precocemente quanto maior for a dose empregada (Fig. 13).

O mesmo experimento foi feito obedecendo um procedimento inverso. Assim, após a adição ao banho de McN (0,1 a 0,2 mcg/ml) e na vigência da descarga aumentada dos potenciais espontâneos, adicionou-se TTX (0,2 a 0,4 mcg/ml). Depois de três minutos, observou-se diminuição da frequência dos mepps seguida de ausência completa desses potenciais (Figs. 12 e 14).

### 3.6.3 - Efeito de pequenas doses de McN sobre a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura:

A Fig. 15 mostra um discreto deslocamento, para a direita, da região central da distribuição de frequência da amplitude dos mepps controle após o tratamen

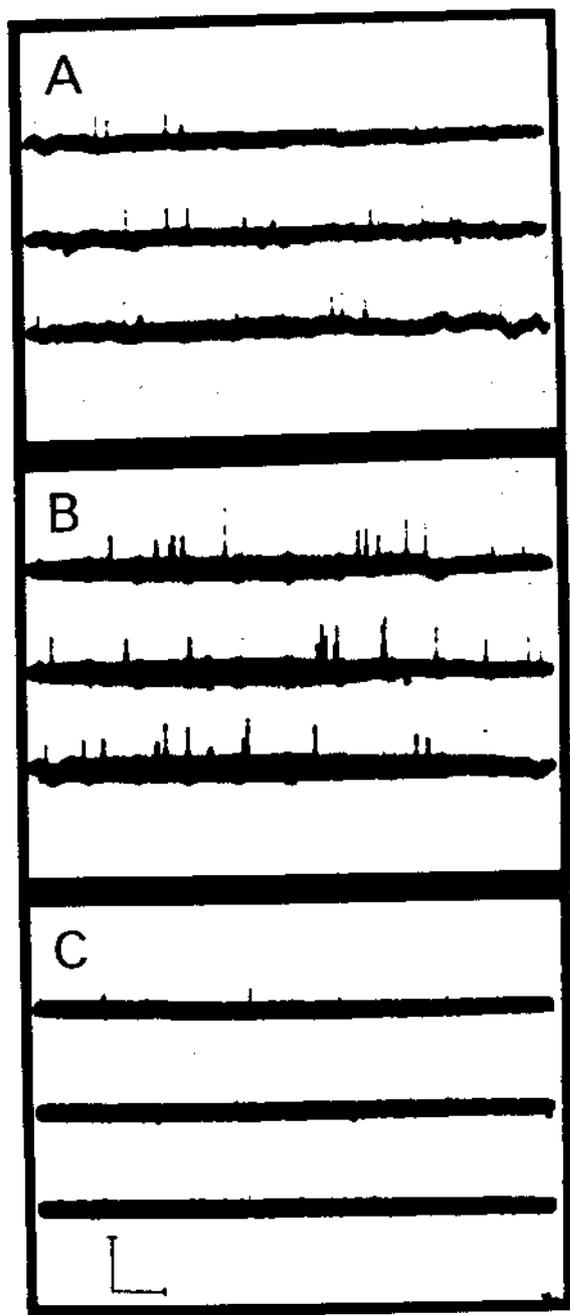


Figura 13 - Registro dos potenciais de placa terminal em miniatura (mepps) em diafragma isolado de rato. Sensibilidade e velo

cidade usadas como na Fig. 11. Em A, registro controle em presença de TTX (0,2 mcg/ml - bloqueio total da transmissão neuromuscular). Em B, registro após 3 a 5 minutos da aplicação de McN (0,1 mcg/ml). Em C, registro após 30 minutos. Notar a ausência de efeito do McN em B e o bloqueio dos mepps em C.

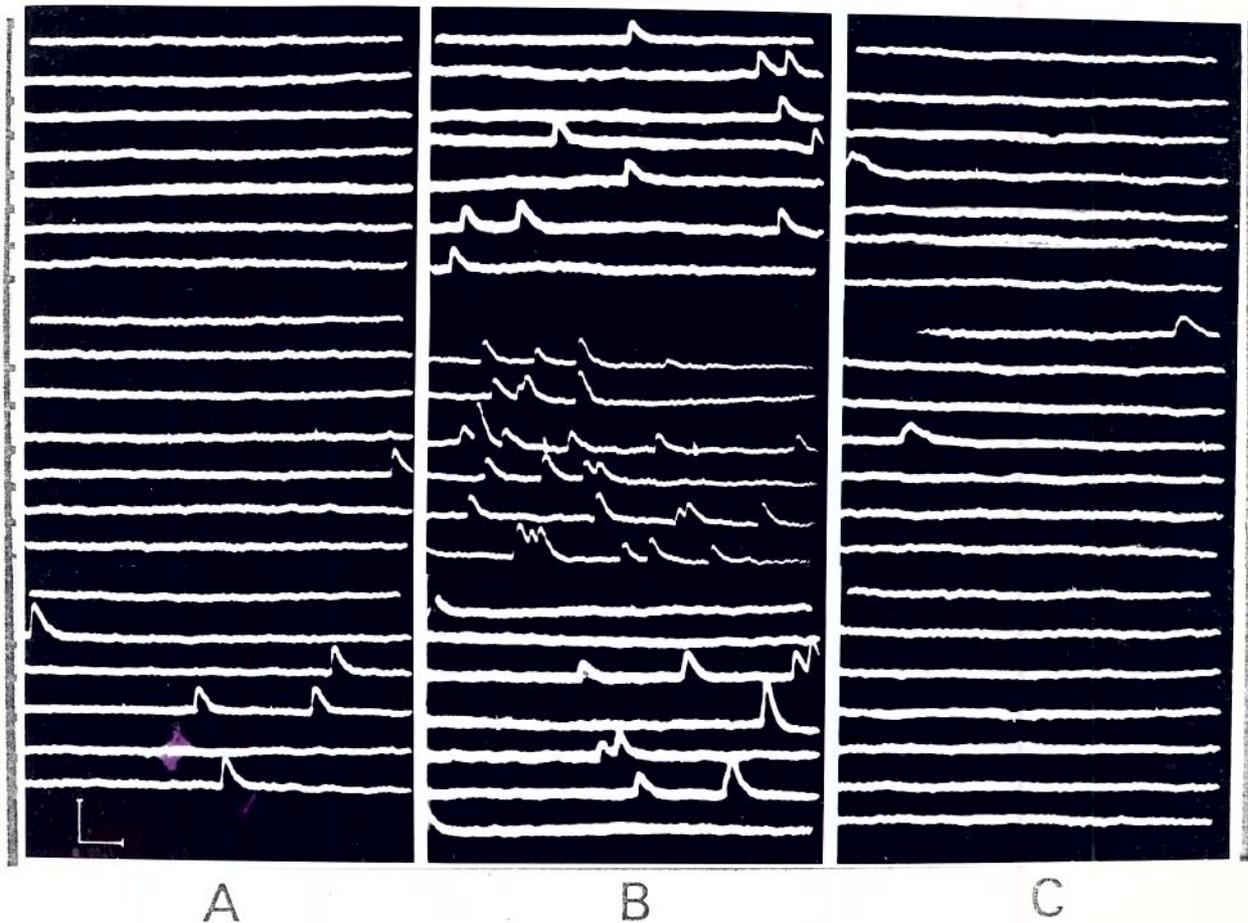


Figura 14 - Registro dos mepps em diafragma isolado de rato. Em A , registro controle; em B, 15-25 minutos após a adição de McN (0,1 mcg/ml); em C, após a adição de TTX (0,2 mcg/ml). Sensibilidade - 0,2 mV (barra vertical). Velocidade - 10 mseg (barra horizontal). Notar o acentuado aumento na frequência dos mepps em B e o correspondente bloqueio da descarga dos mepps pela TTX em C.

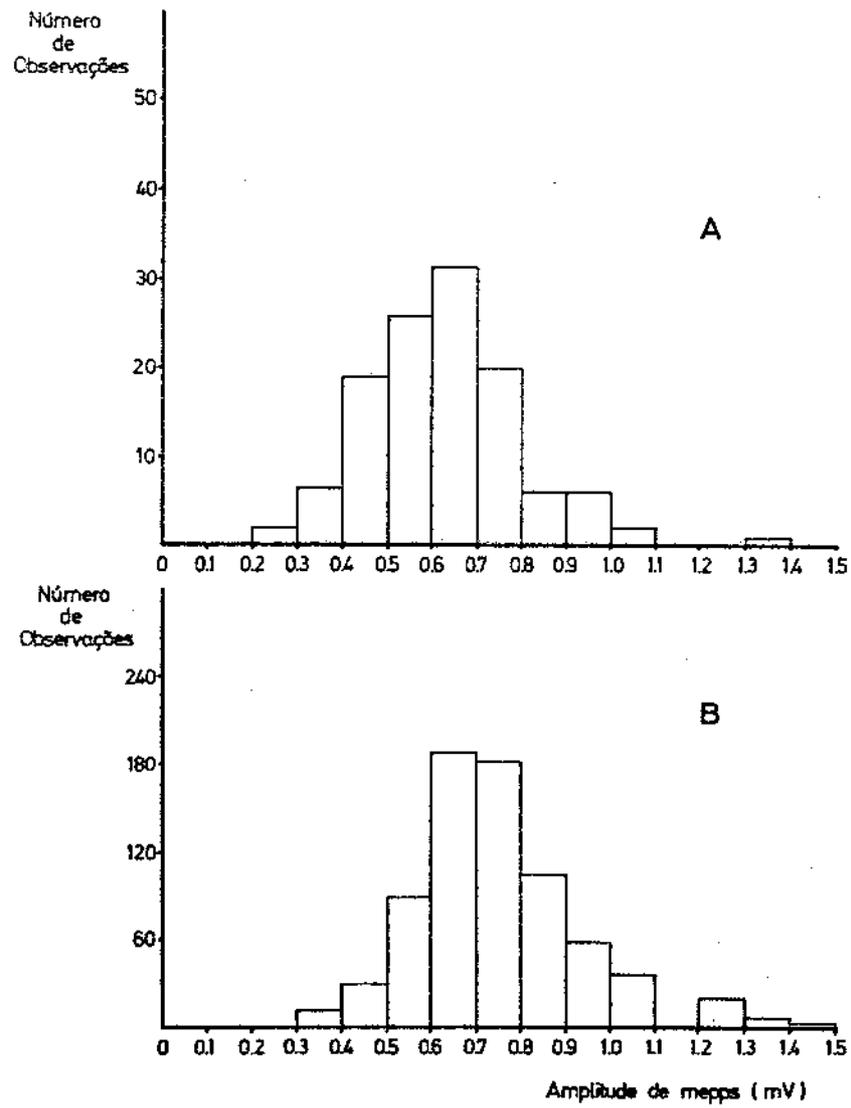


Figura 15 - Distribuição de frequência da amplitude dos potenciais de

placa terminal em miniatura. Em A, amplitude controle. Em B, após a adição de MCN (0,1 a 0,2 mcg/ml). Notar: 1º) o discreto mas significativo deslocamento para a direita - desta distribuição de frequência; 2º) que em B, o eixo das ordenadas apresenta uma escala reduzida seis vezes em relação a A, o que também revela um aumento da frequência dos mepps.

to da preparação com baixas concentrações de McN. O cálculo das médias das duas distribuições de frequências revelou valores correspondentes a 0,58 mV e 0,69 mV, respectivamente antes e depois do McN. Submetendo-se estas médias a teste de significância, verificou-se que apresentam diferença significativa a nível de 5%.

#### 3.6.4 - Medida do potencial de membrana (PM) da fibra muscular do diafragma isolado de rato:

A medida do potencial de repouso foi feita fora e na região das placas terminais da fibra muscular. Como mostram os resultados, sumarizados na Tabela 1, pequenas doses de McN (0,1 a 0,3 mcg/ml) praticamente não modificam os valores do potencial de membrana na região da placa terminal ou em toda a extensão da fibra. Por outro lado, é evidente a redução do potencial de membrana causado por elevadas doses de McN (10 a 30 mcg/ml) somente na região da placa motora permanecendo o restante da membrana da fibra com valores próximos ao controle.

A Tabela 1 mostra ainda que, o efeito despolarizante máximo do composto ocorre no tempo de 15 mi-

TABELA 1 - Efeito do McN sobre o potencial de repouso da fibra muscular.

McN (mcg/ml)	Região de Registro	Controle	5 min.	10 min.	15 min.	30 min.
0,1	Placa	71.4 ± 0,2	68.8 ± 1.8	75.7 ± 14.3	74.7 ± 2.5	77.4 ± -
	Fora da Placa	78.7 ± 7.4	72.2 ± 5.1	76.4 ± 0.1	78.6 ± 2.7	75.1 ± 4.4
0,3	Placa	83.5 ± 5.4	85.7 ± 3.0	76.4 ± 4.5	73.3 ± 1.1	72.8 ± 4.2
	Fora da Placa	84.9 ± 6.7	88.2 ± 2.5	86.1 ± 5.0	77.3 ± 3.3	80.8 ± 2.3
10	Placa	85.5 ± 4.2	74.7 ± 4.8	56.7 ± 12.3	36.2 ± 1.4	34.5 ± -
	Fora da Placa	85.3 ± 4.2	85.2 ± 1.7	67.7 ± 8.1	62.0 ± 11.5	56.6 ± -
30	Placa	75.0 ± 5.3	68.3 ± 0.3	64.2 ± 4.0	54.8 ± 1.8	64.2 ± 0.5
	Fora da Placa	78.3 ± 3.5	77.1 ± 2.5	78.6 ± 2.0	74.1 ± 4.6	74.0 ± 5.9

Em cada experiência, o potencial de membrana do diafragma isolado de rato foi registrado na região da placa terminal e ao longo da fibra, nos períodos indicados. Os dados correspondem à Média ± Desvio Padrão dos valores dos potenciais de membrana em 2 a 3 experimentos.

nutos; tendo-se verificado no tempo de 30 minutos, uma tendência à volta do potencial aos valores iniciais.

As médias representativas dos valores dos potenciais de membrana registrados fora e na região da placa terminal, foram submetidos à análise de variância, cujos resultados são apresentados no Quadro I. O exame deste quadro mostra que não há diferença significativa entre os tempos e entre as doses. Em relação às doses, este resultado pode ser explicado admitindo-se que nas pequenas doses (0,1 a 0,3 mcg/ml) o McN praticamente não revelou modificação dos valores do potencial de repouso da fibra muscular, mascarando, deste modo, o efeito das doses mais elevadas. Pelo mesmo motivo também o efeito do composto no tempo se mostrou não significativo. Verificou-se, ainda, uma diferença significativa entre regiões.

Constatou-se também uma interação significativa entre a dose e tempo e dose e região, indicando que as várias doses atuam de modo diverso em relação aos tempos e regiões estudadas.

Quadro I - Análise da variância dos dados da Tabela 1.

Causas de Variação	G.L.	SQ	QM	F	
tempo	4	1238,0	309,5	1,9876	n.s
dose	3	1436,707	478,902	2,360	n.s
região	1	667,489	667,489	7,077*	
Tempo x dose	12	1721,618	143,468	7,787*	
Tempo x região	4	117,346	29,336	1,592	n.s
Dose x região	3	202,947	67,649	3,672*	
Tempo x dose x região	12	221,068	18,422		
Total	39	5605,175			

Com o objetivo de esclarecer os resultados da análise da variância (efeito não significativo de dose), ou seja, dissociar os efeitos das pequenas e grandes doses do composto cujo agrupamento determinou o aparecimento de efeito não significativo das doses, sobre o potencial de membrana acusado pela referida análise, submetem-se as interações ao teste de Tukey (PIMENTEL GOMES, 1973), que aponta as doses de McN responsáveis pela redu-

ção do PM. Os dados do Quadro II demonstram: 1º) que as médias dos potenciais de membrana da região fora da placa - não apresentam diferença significativa quando relacionadas a todas as doses de McN empregadas; 2º) que relacionando - se as médias dos potenciais de membrana dentro da região - da placa obtem-se interações que exibem diferença signifi- cativa ( dose de 10 x 0,1 e 0,3 mcg/ml e dose de 30 x 0,3 mcg/ml); 3º) que as doses de 10 e 30 da placa, quando rela- cionadas com as demais doses na região fora da placa, apre- sentam diferença significativa em todos os casos, com exce- ção da dose de 10, fora da placa; 4º) que para as doses - baixas 0,1 e 0,3 da placa a diferença é não significativa em relação a todas das doses baixas ou elevadas de fora da região da placa terminal. Constitui-se numa exceção, a dose 0,1 da placa x 0,3 de fora da placa terminal.



3.6.5 - Efeito da dTc sobre a redução do potencial de repouso produzido por doses elevadas de McN.

A dTc na concentração de 10 mcg/ml bloqueia a redução do potencial de repouso induzida por doses elevadas de McN (30 mcg/ml). Analisando estatisticamente este efeito inibitório da dTc sobre a ação despolarizante de grandes doses de McN, chegou-se aos resultados apresentados no Quadro III:

Quadro III - Análise da variância dos dados da Tabela 2 para inibição da dTc sobre o efeito do McN (30 mcg/ml) no potencial de repouso da fibra muscular.

Causas da Variação	G.L.	SQ	QM	F
tempo	4	270,6839	67,6707	4,7733*
inibição (McN x dTc)	1	148,5125	148,5125	10,4758*
região	1	300,3125	300,3125	21,1835*
resíduo	13	184,2975	14,1767	
Total	19			

TABELA 2 - Efeito do McN sobre o potencial de repouso da fibra muscular e seu antagonismo pela dTc.

McN (mcg/ml)	d-Tc (mcg/ml)	Região de Registro	Controle	5 min.	10 min.	15 min.	30 min.
30	0	Placa	75.0 ± 5.3	68.3 ± 0.3	64.2 ± 4.0	54.8 ± 1.8	64.2 ± 0.5
		Fora da Placa	78.3 ± 3.5	77.1 ± 2.5	78.6 ± 2.0	74.1 ± 4.6	74.0 ± 5.9
	10	Placa	82.1 ± 6.2	75.1 ± 2.5	71.9 ± 3.2	73.7 ± 5.4	67.8 ± 1.2
		Fora da Placa	84.8 ± 2.4	78.4 ± 3.7	76.8 ± 2.8	76.4 ± 10.0	76.1 ± 4.8

Registro do potencial de membrana como na Tabela 1.

Verificou-se, portanto, o seguinte:

1) que as interações tempo x inibição , tempo x região e inibição x região, são significativas , realizando-se a análise sem levar em conta estas interações;

2) que foi significativa a variação da resposta do músculo em relação aos vários períodos de tempos analisados;

3) que foi também significativa a diferença entre as duas regiões analisadas;

4) que a inibição produzida pela dTc na região da placa terminal é significativa. Para a determinação do período de tempo responsável pela maior intensidade de efeito foi feito um teste de Tukey para tempos, assinalado no Quadro IV.

O exame do Quadro IV mostra que:

1º) analisando-se o conjunto total (regiões e inibição) fica demonstrado que existe diferença significativa em relação ao tempo de 15 minutos;

2º) a análise do conjunto inibição por região reproduz o mesmo resultado do conjunto total, mas somente para a região da placa mantendo-se não significativo o efeito do composto na região fora da placa traduzido por uma diferença não significativa entre as médias dos conjuntos analisados;

3º) o resultado se repete para o conjunto inibição por região, ou seja, diferença significativa entre as médias sempre a partir do tempo de 15 minutos, mas somente na ausência de dTc.

Demonstra-se deste modo a eficácia do tratamento da preparação com o inibidor, em impedir diferença significativa entre as médias correspondentes dos potenciais de repouso da fibra muscular que tem seu momento de maior redução aos 15 minutos.

Quadro IV - Análise dos dados do Quadro III através do teste de Tukey para tempos.

Tempos (conjunto regiões e inibição)

$\Delta 5\% = 8,377$

Tempo	Média	Significância
0	80,050	] ]
5	74,725	
10	72,875	
15	69,750	
30	70,525	

Tempos (conjunto inibições) por região

$\Delta 5\% = 11,85$

Na Placa			Fora da Placa		
Tempo	Média	Significância	Tempo	Média	Significância
0	78,55	] ]	0	81,55	] ]
5	71,70		5	77,55	
10	68,05		10	77,70	
15	64,25		15	75,25	
30	66,00		30	75,05	

Tempo (conjunto regiões) por inibição

Sem dTc			Com dTc		
Tempo	Média	Significância	Tempo	Média	Significância
0	76,65	] ]	0	83,45	] ]
5	72,70		5	76,75	
10	71,50		10	74,35	
15	64,45		15	75,05	
30	69,10		30	71,95	

As barras abrangem as médias que não apresentam diferença significativa.

DISCUSSÃO

É sobejamente conhecida a importância conferida à preparação ciático-tibial anterior de gato em virtude da sua específica capacidade de comportar-se de modo peculiar frente às drogas colinomiméticas (CHEYMOL e BOURILLET, 1972). A este propósito, a pronunciada relação de estrutura química entre o McN e o mediador colinérgico nos induziram, inicialmente, na análise de alguns resultados observados em nossas experiências, altamente sugestivos da interação do composto com receptores nicotínicos da

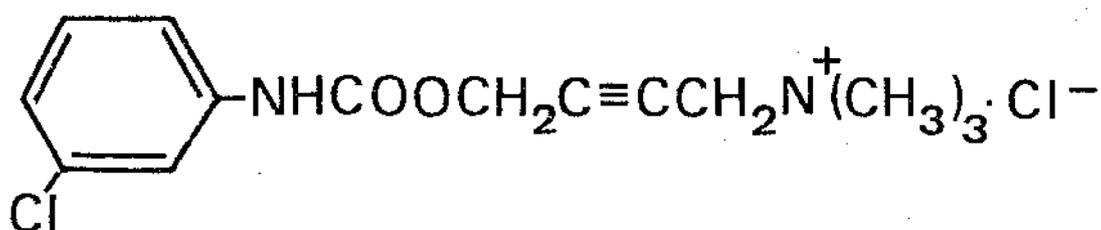


Figura 1 - Cloreto de 4-(m-clorofenil-carbamoiloxi)-2-butínil-trimetil-amônio.

placa motora. Assim, a obtenção do "twitch" nas preparações inervadas e da contratura nas desnervadas, esta última bloqueada pela dTc, nos sugeriram formular, como primeira hipótese, uma ação colinomimética do McN. A ocorrência

frequente de fasciculações (Fig. 4) e as modificações miográficas observadas em seguida ao "twitch" reforçaram ainda mais esta possibilidade, pois a contração tetânica mantida e a pronta reversibilidade do bloqueio (Fig. 3) são características idênticas às descritas com a succinilcolina e o decametônio (CHEYMOL e BOURILLET, 1972).

Entretanto, a pequena potência de ação do composto - cerca de 100 a 200 vezes menos ativo do que o decametônio bem como o discreto e prolongado aumento de amplitude das contrações, em precedência ao bloqueio neuromuscular, sistematicamente induzido pelo McN quando injetado em doses adequadas pela via venosa, divergem das características típicas dos colinomiméticos da placa motora cujo efeito estimulante, por esta via, é sempre imediato, intenso e fugaz.

Portanto, tornou-se claro que o McN poderia ter um mecanismo de ação misto que envolvesse, além da referida interação com os receptores nicotínicos da placa motora, outras atividades que pudessem contribuir indiretamente na ativação desses receptores.

Uma vez mais em função da acentuada semelhança de estrutura química com a acetilcolina, foi aven

tada a hipótese do composto inibir a acetilcolinesterase , hipótese altamente sugestiva em virtude da presença na estrutura molecular do McN de uma ligação carbâmica, característica dos principais agentes anticolinesterásicos (KOELLE, 1975). A comprovação desta atividade "in vivo", exatamente dentro do intervalo de doses estimulantes do composto, e confirmada "in vitro", embora de pequena magnitude, sugere que a mesma deva desempenhar algum papel no mecanismo de ação do composto. A este propósito, merece ser citada a semelhança de efeitos entre o McN e os anticolinesterásicos no que diz respeito ao discreto porém prolongado aumento da amplitude das contrações que promovem nas preparações neuromusculares, fato que, por si, indicaria essa atividade do composto como a responsável pelo efeito estimulante inicial (BOWMAN e cols. 1970).

Essas considerações, por outro lado, não afastavam um eventual efeito colinérgico do McN, para cuja análise escolheu-se o diafragma isolado de rato, pois trata-se de preparação que proporciona estudo comparativo das alterações miográficas, relacionando-as com os achados eletrofisiológicos, e que, nas nossas experiências, foi capaz de reproduzir os resultados obtidos com o tibial anterior .

Assim, verificamos que no mesmo intervalo de doses em que se verificava aumento da amplitude das contrações da preparação isolada, desencadeava-se correspondente aumento da frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura - sem, no entanto, modificar significativamente o valor do potencial de membrana. Desde que a frequência dos potenciais espontâneos é uma função de polarização da membrana pré-juncional (LILEY, 1956; LANDAU, 1969), o aumento na frequência desses potenciais pelo McN implica numa despolarização do nervo motor terminal, pois a frequência de descarga é determinada diretamente pelo potencial de membrana da terminação nervosa e não pelo potencial da fibra muscular (del CASTILLO e KATZ, 1954). Portanto, o fato de o McN induzir aumento da frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura, constitui uma forte indicação de uma ação estimulante pré-juncional do composto, com a consequente liberação de acetilcolina (KATZ, 1972) dos terminais somáticos colinérgicos. Esta evidência coincide com os achados de MURAYAMA e cols. (1963) em terminações nervosas de características anatômicas e fisiológicas análogas, isto é, as pré-ganglionares colinérgicas do simpático, pois registraram um aumento da descarga dos potenciais

em miniatura no gânglio mesentérico inferior submetido à injeção intra-arterial de McN em concentrações da ordem de 10 mcg/ml.

O McN em pequenas doses, além de aumentar a frequência dos mepps, aumenta também a sua amplitude. Portanto, o fato de ter-se verificado um aumento significativo na média da distribuição de frequência da amplitude dos mepps, pode ser explicado considerando que na vigência de aumento da frequência dos potenciais espontâneos, a chance de ocorrer a liberação de mais de um quanta de acetilcolina ao mesmo tempo, é acentuadamente maior. Por outro lado, não existe a possibilidade de que este aumento da amplitude seja devido a demonstrada atividade anticolinérgica do McN. Isto porque nas doses do composto nas quais se evidencia este efeito, não se detecta inibição da hidrólise da acetilcolina.

O bloqueio causado pela TTX sobre o aumento da frequência dos mepps, além de comprovar a importância do componente pré-sináptico no mecanismo de ação do McN, sugere uma possível ação despolarizante do composto nos terminais nervosos somáticos, através do aumento da condutância ao sódio.

Merece ser citado que outros agentes colinérgicos como o carbacol por exemplo, que apresenta grande afinidade de estrutura química com a ACh e o McN, quando testados em presença da mesma concentração de TTX usada em nossos experimentos, continua a provocar a descarga dos mepps (ELMQVIST e FELDMAN, 1965; MIYAMOTO e VOLLE, 1974) , fato que sugere uma diferença entre as ações pré-sinápticas do carbacol e do McN, pois é flagrante o efeito inibitório da TTX sobre a ação estimulante pré-juncional do composto em estudo.

Por outro lado, o emprego de maiores doses de McN (concentrações no banho variáveis de 4 a 30 mcg/ml) mostrou uma relação entre a progressiva e significativa queda dos valores do potencial de membrana na região das placas terminais e a intensidade do bloqueio neuromuscular, o qual resultaria de uma despolarização persistente da placa motora. Verificando-se que, dentro deste intervalo de doses, o fenômeno se limita à região da placa terminal e que a dTc antagoniza este efeito, fomos levados a supor que a estimulação de receptores nicotínicos esteja envolvida no processo. Embora não possa ser excluída uma participação da acetilcolina liberada pelo composto e

por ele potencializada através da referida ação anticolinesterásica, consideramos mais provável que a ação colinomimética do McN seja a única responsável pelo bloqueio por despolarização persistente, pois neste intervalo de doses (4 a 30 mcg/ml) não se observam mais os potenciais espontâneos que refletem a liberação do mediador. Além disso, ao se aplicarem as maiores doses de McN o bloqueio que se instala, quer pela via arterial, quer em órgão isolado, se faz prontamente e, portanto, difícil de ser explicado através de mecanismos indiretos. Portanto, mesmo tendo sido demonstrada a pequena potência do McN, se o mesmo for aplicado em doses adequadamente elevadas, poderá agir como um estimulante direto dos receptores nicotínicos devendo ser o responsável pelo "twitch" causado no tibial anterior de gato, além da despolarização persistente, responsáveis pelo bloqueio neuromuscular. A este propósito, embora uma vez mais tenhamos que salientar a pequena potência do composto, deve ser lembrado que sua ação colinomimética foi por nós demonstrada na preparação desnervada onde o efeito contraturante do McN foi completamente bloqueado pela dTc.

Em concentrações mais elevadas, o composto passa a inibir os efeitos da acetilcolina e seus pró

prios efeitos por mecanismo não estudado no presente trabalho. E, embora não se possa excluir de todo a possibilidade do McN produzir o bloqueio através da despolarização persistente por ele provocado ao nível da placa motora.

Finalmente, é bem provável que o fato de não havermos encontrado um antagonismo do tipo competitivo entre o McN e a dTc no reto abdominal de sapo (SIMIONI e cols., 1975), se deva exatamente à multiplicidade de ações do composto ao nível da junção neuromuscular, reunindo, pelo menos, uma ação pré-sináptica provavelmente despolarizante das terminações nervosas colinérgicas, seguida de outra pós-sináptica, despolarizante da placa motora. O efeito inibitório, não estudado no presente trabalho, deverá decorrer de uma ação do McN sobre a porção inespecífica da fibra muscular.

## RESUMO E CONCLUSÕES

As ações do McN-A-343 (McN) - potente estimulante ganglionar não-nicotínico - na junção neuromuscular foram estudadas em preparações inervadas e desnervadas dos músculos tibial anterior de gato "in situ" e diafragma isolado de rato, empregando-se técnicas miográficas e eletrofisiológicas.

Com base nos nossos resultados e nas considerações tecidas a respeito, podemos concluir que:

1º) o McN apresenta dois tipos de efeitos na junção neuromuscular, dissociáveis pelo emprego de diferentes níveis de concentração do composto, isto é, um efeito estimulante quando aplicado em pequenas doses e, um efeito bloqueador que se instala após a aplicação de altas doses;

2º) o efeito estimulante, traduzido por um discreto porém prolongado aumento da amplitude da contração das referidas preparações, decorre fundamentalmente da despolarização dos terminais nervosos motores, evidenciada através do aumento da frequência da descarga dos potenciais de placa terminal em miniatura (mepp) e, em menor grau, da discreta atividade anticolinesterásica do composto observada "in vivo" e comprovada "in vitro" na vi

gência da aplicação de pequenas doses de McN;

3º) a ação pré-juncional do McN deverá se processar através do aumento da condutância ao sódio, pois esta ação é inibida pela tetrodotoxina;

4º) o efeito bloqueador, traduzido por uma redução progressiva da amplitude das contrações das preparações inervadas e que pode, ocasionalmente, ser precedido por breve estímulo da preparação, decorre inicialmente da despolarização persistente das placas motoras demonstrada através da medida do potencial de repouso em preparações isoladas de diafragma de rato. Esta ação pós-juncional deve resultar da ativação de receptores nicotínicos pela acetilcolina liberada em decorrência da referida ação pré-juncional do composto e, pelo próprio McN que se mostrou capaz de provocar "twitches" no tibial anterior inervados e contraturas nas preparações desnervadas, ambos efeitos bloqueados pela d-tubocurarina, a qual, pelo contrário, potencializa as ações do composto na sinapse ganglionar;

5º) quando do emprego de maiores doses, ao bloqueio por despolarização persistente, soma-se posteriormente, um segundo componente que reforça o efeito blo-

queador, ou seja, uma ação inibitória direta do McN sobre a membrana da fibra muscular, evidenciada no tibial anterior desnervado através da conhecida curva de auto-inibição do composto, cujo mecanismo de ação não foi objeto de análise no presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, E.X.; WARNICK, J.E. e SANSONE, F.M. (1971) -  
The pharmacology of batrachotoxin. II. Effects  
on electrical properties of the mammalian nerve  
and skeletal muscle membranes. J. Pharmacol.  
Exp. Ther., 176(3): 511-521.
- BOWMAN, W.C.; RAND, M.J. e WEST, G.B. (1970) - Farmacolo -  
gia (Jims-Barcelona) p. 138.
- BROW, G.L. (1938) - The preparation of the tibialis ante-  
rior (cat) for close arterial injections. J.  
Physiol. (Lond), 92: 22P-23P.
- BULBRING, E. (1946) - Observations on the isolated phre-  
nic nerve diaphragm preparation of the rat.  
Brit. J. Pharmacol., 1: 38-
- CHEYMOL, J. and BOURILLET, F. (1972) - Inhibitors of post-  
synaptic receptors. In Neuromuscular Blocking  
and Stimulating Agents. J. Cheymol (ed.), Perga-  
mon Press, Oxford, pag. 297.

CORRADO, A.P.; SOUZA, J.M. e BAREICHA, I. (1966) - Neuro-muscular action a McN-A-343 a non nicotinic ganglionic stimulant. Abstract nº 272, 3rd International Pharmacological Congress.

De1 CASTILHO, J. e KATZ, B. (1954) - Changes in end-plate activity produced by pre-synaptic polarization. J. Physiol. 124: 586-604.

De1 CASTILHO, J. e KATZ, B. (1954) - The membrane change produced by the neuromuscular transmitter. J. Physiol. (London) 125: 546-565.

DINIZ, C.R. e TORRES, J.M. (1968) - Release of acetylcholine - like substance from guinea-pig ileum by scorpion venom. Toxicon, 5: 277.

DOUGLAS, W.W. e LYWOOD, D.W. (1961) - The stimulant effect of TEA on acetylcholine output from the superior cervical ganglion: Comparison with barium. Fed. Proc., 20: 324-

- ELMQVIST, D. e FELDMAN, D.S. (1965) - Spontaneous et a mammalian neuromuscular junction in tetrodotoxin. Acta Physiol. Scand. 64: 475-476.
- EXCELL, B.J. (1970) - Experiments on synaptic transmission using the frog sartorius nerve-muscle preparation. Exp. in Physiol. and Biochem., 3: 211-232.
- HOFMANN, W.W.; PARSONS, R.L. e FEIGEN, G.A. (1966) - Effects of temperature and drugs on mammalian motor nerve terminals. Amer. J. Physiol., 211: 135-140.
- KATZ, B. e MILEDI, R. (1972) - The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. J. Physiol., 224: 665-699.
- KOELLE, G.B. (1975) - Anticholinesterase agents. In the Pharmacological Basis Therapeutics. L.S. Goodman and Gilman (eds.) The Macmillan Co. INC, New York, p. 450.

- LANDAU, E.M. (1969) - The interaction of presynaptic polarization with calcium and magnesium in modifying spontaneous transmitter release from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol.* 203: 281-299.
- LEE, C.Y. e CHANG, C.C. (1966) - Modes of actions of purified toxins from elapid venous on neuromuscular transmission. *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, 33(2): 555-572.
- LILLY, A.W. (1956) - The effects of presynaptic polarization on the spontaneous activity at the mammalian neuromuscular junction. *J. Physiol.* 134: 427-443.
- McKINSTRY, D.N.; KOENIG, E.; KOELLE, W.A. e KOELLE, G.B. (1963) - The release of acetylcholine from a sympathetic ganglion by carbachol. *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 41: 2599-2609.
- MIYAMOTO, M.D. e VOLLE, R.L. (1974) - Enhancement by carba

chol of transmitter release from motor nerve - terminals. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 71(4): 1489-1492.

MURAYAMA, S. e UNNA, K.R. (1963) - Stimulant action of 4-(m-chlorophenylcarbamoxy)-2-butynyltrimethylammonium chloride (McN-A-343) on sympathetic ganglia.

OTSUKA, M. e ENDO, M. (1960) - The effect of guanidini on neuromuscular transmission. J. Pharmacol., 128: 273-282.

PIMENTA, A.F. (1975) - Liberação de acetilcolina de tecido nervoso pela tityustoxina. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP).

PIMENTEL GOMEZ, F. (1973) - Curso de estatística experimental - 5a. ed. Liv. Nobel - São Paulo S.A.

ROSZKOWSKI, A.P. (1961) - An unusual type of sympathetic

ganglionic stimulant. J. Pharmacol. Exp. Ther.,  
132: 156-170.

SIMIONI, L.R.; CORRADO, A.P. e JURKIEWICZ, A. (1975) - Differences between effects of McN-A-343 and acetylcholine in toad rectus abdominis. Abstracts on Symposium on receptors and active centers of enzymes. Belo Horizonte, M.G.

TERRONE, L.R.; H.W. CHANG e Y.T. CHEN (1972) - Purification of Acetylcholinesterase by affinity chromatography and determination of active site. Stoichiometry. J. of Biological Chemistry, 247(5) : 1555-1565.

VITAL BRAZIL, O. (1965) - Ação neuromuscular da peçonha de Micrurus. O Hospital, 68(4): 909-949.

VITAL BRAZIL, O. e EXCELL, B.J. (1970) - Action of crotoxin and crotactin from the venom of Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. J. Physiol.,

212: 34-35P.

VITAL BRAZIL, O.; NEDER, A.C. e CORRADO, A.P. (1973) - Effects and mechanism of action of Tityus serrulatus venom on skeletal muscle. Pharmacol. Res. Com., 5(2): 137-