

corrigido

ANTONIO CARLOS NEDER
Cirurgião Dentista

LIBERAÇÃO DE ACETILCOLINA PELA PEÇONHA DE ESCORPIÃO
(Tityus serrulatus)

Tese apresentada à Faculdade de
Farmácia e Odontologia de Piracic
caba, para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências (FARMACOLOGIA)

Piracicaba

1966

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS

Biblioteca Central

Este trabalho é dedicado:

Ao PROFESSOR DOUTOR CARLOS
HENRIQUE ROBERTSON LIBERALLI-pe
lo estímulo e apoio irrestrito
que nos proporcionou.

À minha esposa e à minha
filha, pela abnegação com que
nos acompanharam nesta árdua
jornada.

IN MEMORIAM

ANTONIO NEDER, meu saudoso pai.

AGRADECIMENTOS

Nossa formação e nosso trabalho se deve ao auxílio de muitos mestres e amigos aos quais deixamos consignados os nossos mais sinceros agradecimentos:

ao PROFESSOR DOUTOR OSWALDO VITAL BRAZIL, orientador desta tese e com quem vimos estagiando há dois anos, nos laboratórios do Departamento de Farmacodinâmica da Faculdade de Medicina da Universidade de Campinas, a nossa gratidão, por sua orientação segura e seus sábios ensinamentos;

ao PROFESSOR DOUTOR GERALDO CLARET DE MELLO AYRES, pela confiança em nós depositada, indicando-nos como responsável pela disciplina de Farmacologia, e por haver possibilitado o nosso estágio na Faculdade de Medicina da Universidade de Campinas;

agradecemos ao PROFESSOR DOUTOR JOSÉ MERZEL, pelo apoio dado no início de nossa carreira, indicando-nos como Instrutor junto à Diretoria da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Piracicaba;

somos gratos pelo auxílio dos DOUTORES MAURÍCIO GOMES LOMBA e JÚLIA DO PRADO FRANCESCHI, bem como do Técnico de Laboratório senhor Nadin Farah Heluany Sobrinho, da Secretária Senhorita Maria Alves de Paula e dos auxiliares senhor Luiz Souza Oliveira e Senhorita Maria Aparecida Moraes, todos do Depar-

tamento de Farmacodinâmica da Faculdade de Medicina da Universi
dade de Campinas;

ao Senhor Sidney Barbosa de Souza, Técnico de Labora-
tório da Cadeira de Materiais Dentários da Faculdade de Farmá--
cia e Odontologia de Piracicaba, pelas fotografias que figuram
na tese.

oooOooo

Í N D I C E

	P.
1 - INTRODUÇÃO	8
2 - MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1 - Peçonha de <u>Tityus serrulatus</u>	10
2.2 - Soluções fisiológicas e anticoagulantes.	10
2.3 - Drogas usadas.	11
2.4 - Liberação de acetilcolina.	12
2.4.1 - Preparação de diafragma inervado de rato	12
2.4.1.1 - Observação da liberação espontânea de acetilcolina.	13
2.4.1.2 - Liberação de acetilcolina pela peçonha de <u>Tityus serrulatus</u>	13
2.4.1.3 - Influência de drogas na liberação da acetilcolina provocada pela peçonha de escorpião.	14
2.4.2 - Preparação de diafragma desnervado de rato	15
2.4.3 - Preparação de íleo isolado de cobaia	15
2.4.4 - Preparação de ganglio celíaco isolado de gato	16
2.5 - Ensaio biológico da acetilcolina	16
2.6 - Caracterização da acetilcolina no líquido nutritivo	17
2.7 - Avaliação estatística.	17
3 - RESULTADOS	18
3.1 - Liberação espontânea de acetilcolina	18
3.2 - Liberação de acetilcolina provocada pela peçonha de <u>Tityus serrulatus</u> . Efeito estimulante da peçonha no diafragma do rato e no íleo da cobaia	18
3.3 - Influência de drogas sobre a liberação de acetilcolina provocada pela peçonha de escorpião	19
4 - DISCUSSÃO.	40
5 - RESUMO E CONCLUSÕES.	44
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

oooOooo

1 - INTRODUÇÃO

Desde longa data os pesquisadores vêm se dedicando ao estudo da peçonha de escorpiões. Já em 1864, GUYON ocupou-se desse assunto referindo-se à sintomatologia do envenenamento es corpiônico no homem.

A partir de então, inúmeros trabalhos foram publicados com referência aos efeitos da peçonha sobre a espécie humana e em animais.

O primeiro pesquisador a estudar os escorpiões brasileiros foi VITAL BRAZIL, em 1907, que chamou a atenção para a gravidade de alguns casos de picadas por êsses aracnídeos, descrevendo a sintomatologia produzida em animais de laboratório e também as observadas no homem. Já naquela época tentou a imunização de animais de laboratório com a peçonha de escorpião com a finalidade de obter o sôro anti-escorpiônico.

Em 1919, HOUSSAY investigou os efeitos da peçonha de escorpião, tendo concluído que a mesma exerce atividade parasimpatomimética e atua no músculo esquelético através de suas placas terminais.

CARVALHO, em 1937, também demonstrou, em preparações isoladas, que a peçonha de escorpião exerce atividade parassimpatomimética.

DEL POZZO, em 1956, utilizando-se de injeção intra-arterial, em gato, confirmou que a peçonha estimula o músculo através da placa terminal.

O. VITAL BRAZIL, em 1963, trabalhando com a preparação

diafragma isolado de rato, verificou que a peçonha produzia -
contrações musculares, abolidas pela d-tubocurarina. Essas con-
trações não ocorriam, porém, quando a preparação empregada era
o diafragma desnervado de rato.

DINIZ, em 1958, sugeriu que os efeitos parassimpatomi-
méticos produzidos pela peçonha de escorpião fossem devidos à
liberação de acetilcolina e Ø.VITAL BRAZIL (1963) que os efei-
tos neuromusculares provocados por ela tivessem a mesma causa.

O objetivo do presente trabalho foi verificar experi-
mentalmente se a peçonha de Tityus serrulatus é capaz de libe-
rar acetilcolina de terminações colinérgicas e pesquisar os ca-
racteres dessa ação liberadora.

ooo0ooo

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Peçonha de Tityus serrulatus

A peçonha seca (*) foi dissolvida na concentração de 1 mg/ml em solução de cloreto de sódio. Essa solução era conservada em congelador a 4°C. No momento da experimentação diluía-se uma alíquota até se obter a concentração final de 20 mcg/ml em solução de Tyrode.

2.2 - Soluções fisiológicas e anticoagulantes

a) Solução de cloreto de sódio a 0,9 por cento.

b) Solução de Tyrode (g/l).

NaCl 8,00

KCl 0,20

CaCl₂ 0,20

MgCl₂ 0,01

NaH₂PO₄ 0,05

NaHCO₃ 1,00

Glicose 2,00

c) Solução anticuagulante: citrato de sódio a 8 por cento.

(*) Cedida gentilmente pelo Doutor Alexandre Pinto Corrado, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

As soluções foram feitas utilizando-se sempre drogas quimicamente puras.

2.3 - Drogas usadas

a) Acetilcolina (Acetylcholine "Roche").

Prepararam-se soluções-mãe com 2 mg/ml de cloreto de acetilcolina. Estas soluções, distribuídas em pequenos frascos, eram conservadas no congelador. A partir dessas faziam-se diluições de modo que cada 0,2 ml contivessem 1, 2, 3 e 4 nanogramas ou quantidades intermediárias.

- b) Metilsulfato de neostigmina (Prostigmine "Roche").
- c) Cloridrato de procaina ("Pantofarma").
- d) Sulfato de neomicina ("Lafi").
- e) Cloreto de d-tubocurarina ("Abott").
- f) Pentobarbital sódico (Nembutal "Abott").
- g) Heparina (Liquemine "Roche").
- h) Brometo de hexametônio (Bistrium "Squibb").
- i) Sulfato de atropina ("Carlo Erba").
- j) Cloreto de magnésio ("Carlo Erba").
- l) Hidrato de cloral ("Pantofarma").
- m) Cloreto de cálcio ("Carlo Erba").
- n) Cloreto de sódio ("Baker").
- o) Cloreto de potássio ("Merck").
- p) Fosfato de sódio monobásico ("Baker").

- q) Bicarbonato de sódio ("Baker").
- r) Glicose ("Baker").

2.4 - Liberação de acetilcolina

A liberação de acetilcolina foi estudada em porções isoladas de diversos tecidos: diafragma inervado e desnervado de rato, íleo de cobaia e gânglio celíaco de gato.

2.4.1 - Preparação de diafragma inervado de rato

O hemidiafragma esquerdo era obtido de ratos albinos, cujo pêso variava de 100 a 200 gramas. Os animais eram prèvia-mente anestesiados pelo hidrato de cloral (350 mg/kg), intrape-ritonealmente. A técnica utilizada foi semelhante à de BULBRING (1946) ficando o hemidiafragma em uma cuba de 5 ml, contendo solução de Tyrode, a 37°C, na qual borbulhava uma corrente de car-bogênio (95 por cento de O₂ e 5 por cento de CO₂). O bordo cos-tal era prêso ao fundo da cuba e a extremidade tendinosa era ligada a uma alavanca de Starling.

Adicionou-se, na maioria dos experimentos, neostigmi-na (5 mcg/ml), à solução de Tyrode.

Com essa preparação foram realizados os seguintes ti-pos de verificações:

2.4.1.1 - Observação da liberação espontânea de acetilcolina

A liberação espontânea de acetilcolina foi estudada na preparação em repouso, antes de juntar-se à cuba a solução de Tyrode com a peçonha escorpiônica.

Inicialmente a preparação era deixada por 30 minutos em solução nutriente. Esta solução era desprezada. A nova solução, após 20 minutos de contato com o hemidiafragma, era utilizada para verificar-se a possível liberação espontânea de acetilcolina pela preparação. Cada milímetro de Tyrode, nestes casos, continha sempre 5 mcg de neostigmina.

Tal conduta precedeu sistematicamente a todas as experiências.

2.4.1.2 - Liberação de acetilcolina pela peçonha de Tityus serrulatus

A liberação de acetilcolina provocada pela peçonha de escorpião foi estudada simultaneamente com a verificação do seu efeito estimulante sobre o diafragma de rato. Ao banho nutriente eram adicionados 20 mcg da peçonha, sendo as contrações da preparação registradas em papel esfumado. Logo a seguir o líquido nutriente era retirado para o ensaio biológico de acetilcolina. Este tipo de experiência foi realizado com nove hemidiafragmas. Entretanto, em duas outras preparações, com a fina-

lidade de se obterem dados relativos à natureza da substância liberada, não se adicionou neostigmina à solução de Tyrode.

2.4.1.3 - Influência de drogas na liberação de acetilcolina provocada pela peçonha de escorpião

Com a finalidade de caracterizar diversos aspectos da ação liberadora de acetilcolina pela peçonha, foram utilizadas diversas substâncias, que, possivelmente, pudessem interferir - nos mecanismos de liberação do referido mediador.

Dessa maneira, estudou-se a influência dos íons cálcio e magnésio, da procaina, neomicina e d-tubocurarina.

Para a verificação da influência do cálcio, utilizaram-se soluções de Tyrode sem cálcio (três experiências), com 50 e com 400 mg de cloreto de cálcio por litro (cinco experiências com cada concentração). O cloreto de magnésio, em três experimentos, foi adicionado à solução de Tyrode, na concentração de 40 mcg/ml.

O cloridrato de procaina foi utilizado em cinco experiências na dose de 400 mcg/ml e o sulfato de neomicina, na de 40 mcg/ml também em cinco experimentos. Pesquisaram-se também, nestas experiências, as influências exercidas pelo íon cálcio - sobre o efeito inibitório da liberação de acetilcolina provocado pelo magnésio, pelo antibiótico e pela procaina.

A ação liberadora da peçonha foi também estudada na presença de 3 mcg/ml de cloreto de d-tubocurarina (cinco expe-

riências) .

2.4.2 - Preparação de diafragma desnervado de rato

A técnica utilizada foi semelhante à anteriormente - descrita. Entretanto, os ratos tiveram seus hemidiafragmas esquerdos previamente desnervados pela técnica de O.VITAL BRAZIL (1963) . à solução de Tyrode adicionou-se neostigmina (5 mcg/kg). Foram obtidas amostras para ensaio biológico da acetilcolina antes e após a adição de 20 mcg de peçonha, em cinco experiências.

2.4.3 - Preparação de íleo isolado de cobaia

O segmento de íleo de cobaia era montado em cuba de 3 ml, contendo solução de Tyrode com neostigmina a 28°C e arejado por meio de borbulhamento de ar na solução nutriente. As contrações da preparação foram registradas com alavanca isotônica. A reatividade da mesma era observada com a adição de 2 mcg de acetilcolina. Amostras do líquido nutriente foram obtidas antes e após a adição de 20 mcg da peçonha e submetidas ao ensaio biológico para a acetilcolina.

2.4.4 - Preparação de gânglio celíaco isolado de gato

Anestesiou-se o gato com pentobarbital sódico (30 mg/kg).

O gânglio celíaco foi retirado e colocado em uma cuba de 5 ml, com solução de Tyrode a 37°C. O sistema foi oxigenado, com carbogênio. A ação liberadora da peçonha foi estudada em três experiências, procedendo-se de modo semelhante ao descrito a propósito das experiências relativas à liberação de acetilcolina do diafragma de rato e do íleo de cobaia.

2.5 - Ensaio biológico da acetilcolina

Para a verificação da presença de acetilcolina nas diversas amostras, realizaram-se ensaios na pressão arterial de gatos. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico - (30 mg/kg, por via intravenosa), traqueotomizados e preparados para o registro da pressão arterial carotídea. Utilizou-se citrato de sódio a 8 por cento como anticoagulante em manômetro - de mercúrio para o registro da pressão arterial. A veia femoral foi canulada para a injeção de drogas.

Foi evitada a injeção de volumes grandes de líquido.- Cada administração era de 0,2 ml tanto da solução a testar como da padrão de acetilcolina, seguida sempre da lavagem da cânula com 0,1 ml de solução de cloreto de sódio.

* A fim de evitar alterações reflexas da pressão arte-

rial bloquearam-se as vias autonômicas eferentes, administrando-se lentamente ao animal uma solução de hexametônio (3 mg/kg) após injeção prévia de efedrina (1 mg/kg).

As amostras foram comparadas com soluções de acetilcolina, contendo 1, 2, 3 e 4 ng em cada 0,2 ml. A título de controle, observou-se o efeito causado na pressão arterial pela injeção de 4 mcg da peçonha.

A dosagem foi obtida pelo método da coincidência de efeitos entre padrão e desconhecido. As soluções foram injetadas intercaladamente.

2.6 - Caracterização da acetilcolina no líquido nutriente

Além do ensaio quantitativo foram também realizadas - provas qualitativas com as amostras obtidas, a fim de se obterem indicações sobre a natureza do princípio hipotensor liberado. Tais provas foram também realizadas com a solução de acetilcolina. Com essa finalidade, procedeu-se à fervura tanto em meio alcalino como em meio ácido e à verificação do efeito inibitório da atropina.

2.7 - Avaliação estatística

O teste "t" foi utilizado, quando necessário, para a verificação de significância das diferenças de liberação de acetilcolina nos diversos grupos experimentais.

3 - RESULTADOS

3.1 - Liberação espontânea de acetilcolina

Nas diversas preparações em repouso não se observou liberação espontânea de acetilcolina em quantidades passíveis de dosagem pelo método utilizado. Entretanto, em algumas experiências, foi possível constatar-se discreta hipotensão produzida pela amostra inicial. (FIG. 3 - 1, 2, 8; FIG. 6 - 1, 2, 3, 4; FIG. 10 - 1). Não foram verificadas diferenças relativas à liberação espontânea de acetilcolina pelos diversos tecidos inervados submetidos à investigação.

3.2 - Liberação de acetilcolina provocada pela peçonha de *Tityus serrulatus*. Efeito estimulante da peçonha no diafragma de rato e no íleo da cobaia.

A presença de uma substância capaz de produzir queda abrupta e fugaz da pressão arterial do gato foi revelada no líquido nutriente contendo neostigmina e peçonha de *Tityus serrulatus* após banhar, pelo espaço de 20 minutos, os tecidos inervados (diafragma do rato, FIG. 2 - 7, 9, 11, 16; FIG. 3 - 4, 5, 7, 9; íleo da cobaia, FIG. 4 - 2, 4, 8; gânglio celíaco do gato, - FIG. 5 - 4, 6, 11). Antes, porém, de permanecer em contato com as preparações, tal solução não alterava a pressão arterial do

gato (FIG. 3 - 3). A administração de atropina (1 mg/kg) ao gato sempre inibiu o efeito hipotensor produzido pela substância liberada (FIG. 3 - 11; FIG. 7 - 12; FIG. 9 - 13). A fervura em meio alcalino, por outro lado, fêz desaparecer sua atividade - (FIG. 2 - 14; FIG. 4 - 5, 6, 7; FIG. 5 - 8, 9; FIG. 8 - 7), o mesmo não ocorrendo quando a fervura foi levada a efeito em meio ácido (FIG. 2 - 16; FIG. 4 - 8; FIG. 5 - 11; FIG. 8 - 10). Além disso tal substância não pôde ser revelada quando a solução de Tyrode não continha neostimina ou quando a preparação utilizada era o diafragma desnervado do rato (FIG. 1). Considera-se, pois, como sendo a acetilcolina a substância em aprêço. A Tabela I mostra os resultados obtidos com a adição da peçonha às diversas preparações utilizadas, na vigência ou não da ação da neostigmina.

Os diafragmas inervados, sob a ação da peçonha, apresentaram pequenas contrações que se sucediam de modo irregular e com amplitude variável (FIGS. 11, 12 e 13). No íleo da cobaia o efeito caracterizou-se por forte aumento do tono da preparação (FIG. 14). As contrações observadas nos músculos inervados, não ocorreram no diafragma desnervado.

3.3 - Influência de drogas sôbre a liberação de acetilcolina provocada pela peçonha de escorpião

A peçonha de *Tityus serrulatus* não ocasionou liberação de quantidades reveláveis de acetilcolina quando as diversas preparações foram incubadas com solução de Tyrode desprovi-

da de cálcio, ou contendo somente 50 mg/l do cloreto dêste ion (Tabela II).

A adição de cálcio ao meio restaurou a capacidade de a preparação liberar acetilcolina, sob a ação da peçonha.

A liberação de acetilcolina foi maior nas experiências, em que se utilizou solução de Tyrode com 400 mg/l de cloreto de cálcio do que naquelas com soluções contendo quantidades usuais dêste sal, isto é, 20 mg/l ($P < 0,05$ e $t = 2,599$) - FIG. 6 - 8, 10).

A Tabela II mostra os resultados obtidos nas experiências em que se variou o teor de cálcio no meio nutriente.

Tanto o íon magnésio como a neomicina inibiram a ação liberadora de acetilcolina pela peçonha de escorpião (FIG. 7 - 1, 2, 3, 4; FIG. 8 - 2, 3). A adição de cloreto de cálcio - mostrou nítido efeito antagônico, restaurando a liberação de acetilcolina (FIG. 7 - 7, 9, 11; FIG. 8 - 4, 6, 10). A Tabela - III mostra a influência do magnésio e da neomicina na liberação de acetilcolina provocada pela peçonha, bem como o efeito restaurador do ion cálcio.

A d-tubocurarina não influenciou a liberação de acetilcolina pela peçonha escorpiônica (FIG. 9 - 6, 9, 11, 15 e Tabela IV). A quantidade de acetilcolina liberada na presença desse agente curarizante não diferiu significativamente da liberada nas experiências - controle ($P > 0,05$ - $t = 1,05$).

A procaina inibiu completamente a liberação de acetilcolina pela peçonha. Tal inibição não foi desfeita pela adição de cloreto de cálcio (FIG. 10 - 6 e Tabela IV). O efeito da procaina foi reversível, verificando-se liberação do mediador quando a peçonha foi adicionada após a retirada da procaina por

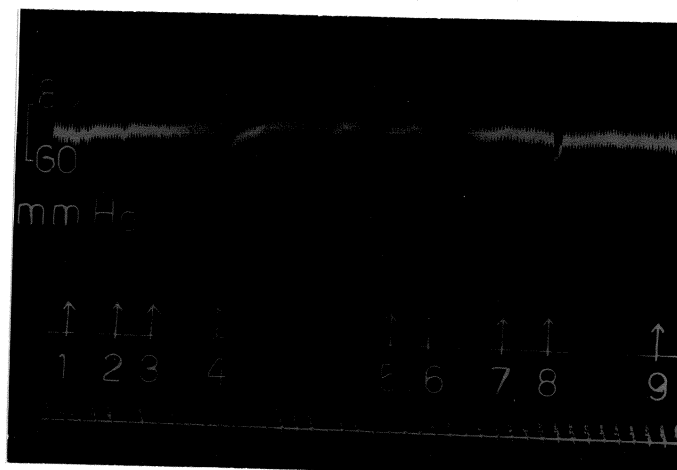
meio de lavagens sucessivas da preparação (FIG. 10 - 8, 13, 15).

Não se observaram as contrações do diafragma quando o líquido nutriente continha a d-tubocurarina, ou neomicina ou procaina ou teor elevado em magnésio. A ausência do cloreto de cálcio na solução de Tyrode condicionou também a supressão das contrações provocadas pela peçonha escorpiônica.

ooo0ooo

FIGURA 1

DOSAGEM, EM GATO, DA ACETILCOLINA LIBERADA PELA PEÇONHA DE ESCORPIÃO NO DIAFRAGMA DESNERVADO DE RATO



Gato σ - 1.300 gramas.

Anestésico - pentobarbital sódico (30 mg/kg)

Heparina - (0,5 ml de Liquemine "Roche")

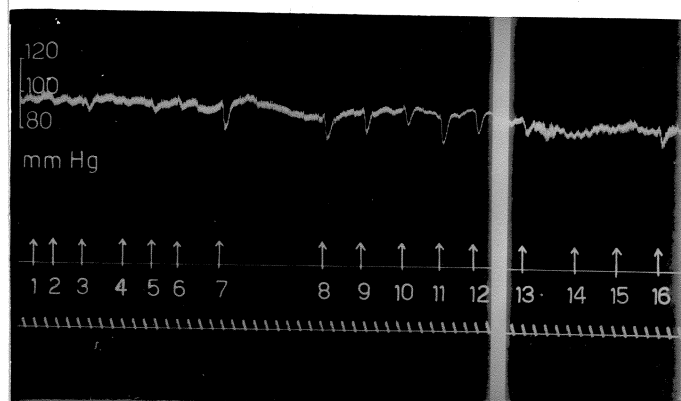
Efedrina - (1 mg/kg)

Hexametônio - (3 mg/kg).

- 1 - Liberação espontânea
- 2 - Liberação espontânea
- 3 - Liberação espontânea
- 4 - 2 ng de acetilcolina
- 5 - Liberação pela peçonha
- 6 - Liberação pela peçonha
- 7 - Liberação pela peçonha
- 8 - 1 ng de acetilcolina
- 9 - Liberação pela peçonha

FIGURA 2

DOSAGEM, EM GATO, DA ACETILCOLINA LIBERADA PELA PEÇONHA DE ESCORPIÃO NO DIAFRAGMA INERVADO DE RATO



Gato ♂ - 800 gramas

Anestésico - pentobarbital sódico (30 mg/kg)

Heparina - (0,5 ml de Lique mine "Roche").

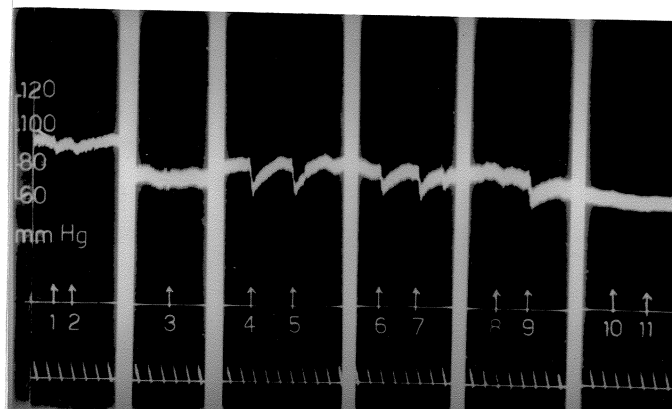
Efedrina - (1 mg/kg)

Hexametônio - (3 mg/kg)

- 1 - Liberação espontânea
- 2 - Liberação espontânea
- 3 - 1 ng de acetilcolina
- 4 - Liberação espontânea
- 5 - 1 ng de acetilcolina
- 6 - 1 ng de acetilcolina
- 7 - Liberação pela peçonha
- 8 - 3 ng de acetilcolina
- 9 - Liberação pela peçonha
- 10 - 2 ng de acetilcolina
- 11 - Liberação pela peçonha
- 12 - 3 ng de acetilcolina
- 13 - 3 ng de acetilcolina, após acidificação e fervura
- 14 - Liberação pela peçonha, após alcalinização e fervura
- 15 - 3 ng de acetilcolina, após alcalinização e fervura
- 16 - Liberação pela peçonha, após acidificação e fervura

FIGURA 3

DOSAGEM, EM GATO, DA ACETILCOLINA LIBERADA PELA PEÇONHA DE ESCORPIÃO NO DIAFRAGMA INERVADO DE RATO



Gato ♀ - 1.000 gramas

Anestésico - pentobarbital sódico (30 mg/kg)

Heparina - (0,5 ml de Liquemine "Roche")

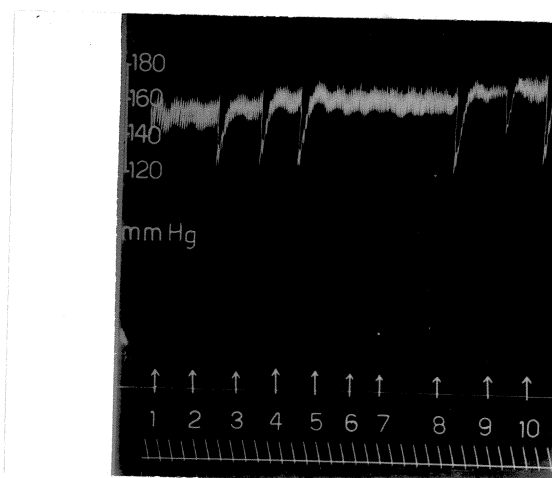
Efedrina - (1 mg/kg)

Hexametônio

- 1 - Liberação espontânea
- 2 - Liberação espontânea
- 3 - Solução Tyrode com neostigmina e peçonha
- 4 - Liberação pela peçonha
- 5 - Liberação pela peçonha
- 6 - 4 ng de acetilcolina
- 7 - Liberação pela peçonha
- 8 - Liberação espontânea
- 9 - Liberação pela peçonha
- 10 - 4 ng de acetilcolina, após atropinização (1 mg/kg do gato)
- 11 - Liberação pela peçonha, após atropinização (1 mg/kg)

FIGURA 4

DOSAGEM, EM GATO, DA ACETILCOLINA LIBERADA PELA PEÇONHA DE ESCORPIÃO NO ÍLEO DE COBAIA

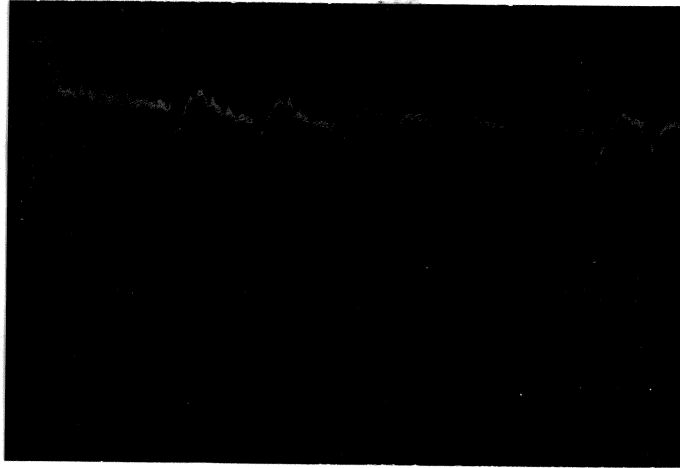


Gato ♂ - 1.600 gramas
Anestésico - pentobarbital sódico (30 mg/kg)
Heparina - (0,5 ml de Liquemine "Roche")
Efedrina - (1 mg/kg)
Hexametônio - (3 mg/kg)

- 1 - Liberação espontânea
- 2 - Liberação pela peçonha
- 3 - 3 ng de acetilcolina
- 4 - Liberação pela peçonha
- 5 - Liberação pela peçonha, após alcalinização e fervura
- 6 - Liberação pela peçonha, após alcalinização e fervura
- 7 - Liberação pela peçonha, após alcalinização e fervura
- 8 - Liberação pela peçonha, após acidificação e fervura
- 9 - 2 ng de acetilcolina
- 10 - 3 ng de acetilcolina, após acidificação e fervura

FIGURA 5

DOSAGEM, EM GATO, DE ACETILCOLINA LIBERADA PELA PEÇONHA DE ESCORPIÃO NO GÂGLIO CELÍACO DE GATO



Gato ♂ - 1.300 gramas

Anestésico - pentobarbital sódico (30 mg/kg)

Heparina - (0,5 ml de Lique mine "Roche")

Efedrina - (1 mg/kg)

Hexametônio - (3 mg/kg)

- 1 - Liberação espontânea
- 2 - Liberação espontânea
- 3 - 2 ng de acetilcolina
- 4 - Liberação pela peçonha
- 5 - 3 ng de acetilcolina
- 6 - Liberação pela peçonha
- 7 - 3 ng de acetilcolina
- 8 - Liberação pela peçonha, após alcalinização e fervura
- 9 - Liberação pela peçonha, após alcalinização e fervura
- 10 - 3 ng de acetilcolina, alcalinizada e fervida.
- 11 - Liberação pela peçonha, após acidificação e fervura
- 12 - 3 ng de acetilcolina, após acidificação e fervura

TABELA I

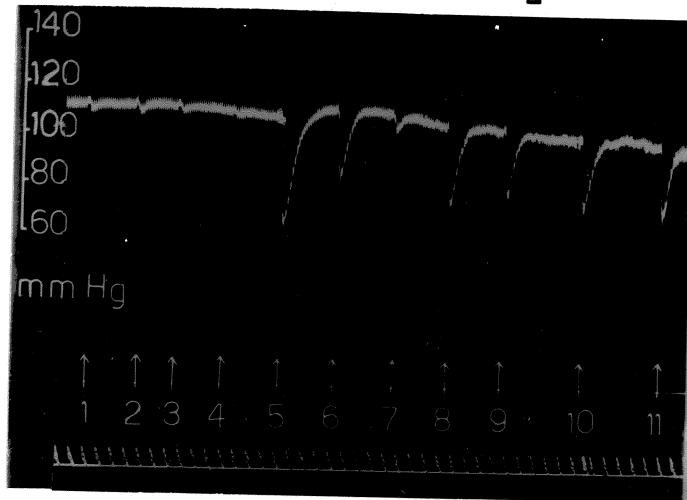
Quantidades (em nanogramas) de acetilcolina liberada pela peçonha de Tityus serrulatus do diafragma do rato, do íleo da cobaia e do gânglio celiaco do gato.

DIAFRAGMA INERVADO DO RATO		Diafragma des-nervado do rato	íleo da cobaia	Gânglio celiaco do gato
Liberção em Tyrode com neostigmína	Liberção em Tyrode sem neostigmína	Liberção em Tyrode com neostigmína	Liberção em Tyrode com neostigmína	Liberção em Tyrode com neostigmína
75,0	0,0	0,0	75,0	50,0
35,0	0,0	0,0	82,5	85,0
27,5	-	0,0	50,0	80,0
50,0	-	0,0	-	50,0
75,0	-	0,0	-	-
50,0	-	-	-	-
50,0	-	-	-	-
75,0	-	-	-	-
50,0	-	-	-	-
54,167 ± 5,83	0,0	0,0	69,17 ± 9,82	66,25 ± 8,19

FIGURA 6

DOSAGEM, EM GATO, DA ACETILCOLINA LIBERADA PELA PEÇONHA DE ES-CORPIÃO NO DIAFRAGMA INERVADO DE RATO

(Tyrode com 400 mg de $\text{CaCl}_2/1$)



Gato ♂ - 1.200 gramas.

Anestésico - pentobarbital sódico (30 mg/kg).

Heparina - (0,5 ml de Liquemine "Roche").

Efedrina - (1 mg/kg).

Hexametônio - (3 mg/kg).

- 1 - Liberação espontânea
- 2 - Liberação espontânea
- 3 - Liberação espontânea
- 4 - Liberação espontânea
- 5 - 4 ng de acetilcolina
- 6 - 3 ng de acetilcolina
- 7 - 1 ng de acetilcolina
- 8 - Liberação pela peçonha
- 9 - 3 ng de acetilcolina
- 10 - Liberação pela peçonha
- 11 - 3,5 ng de acetilcolina

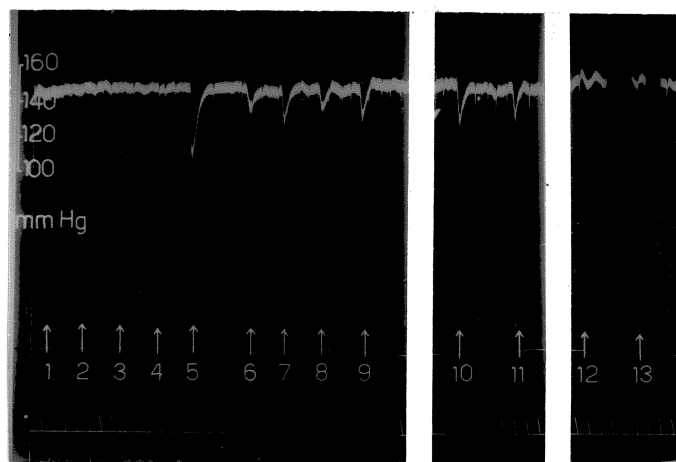
TABELA II

Influência do íon cálcio sobre a liberação de acetilcolina provocada pela peçonha de Tityus serrulatus do diafragma de rato.

Liberação em Tyrode sem cálcio e após a sua adição		Liberação em Tyrode com 50 mg/l de cloreto de cálcio	Liberação em Tyrode com 400 mg/l de cloreto de cálcio
Sem cloreto de cálcio	Com cloreto de cálcio (200 mg/l)		
0,0	59,25	0,0	62,50
0,0	62,00	0,0	72,50
0,0	58,00	0,0	78,50
-	-	-	65,00
-	-	-	80,00
0,0	59,75 ± 1,18	0,0	75,70 ± 3,14

FIGURA 7

DOSAGEM, EM GATO, DA ACETILCOLINA LIBERADA PELA PEÇONHA DE ESCORPIÃO NO DIAFRAGMA INERVADO DE RATO (Influência do íon magnésio).



Gato ♂ - 1.150 gramas.

Anestésico - pentobarbital sódico (30 mg/kg).

Heparina - (0,5 ml de Liquemine "Roche").

Efedrina - (1 mg/kg).

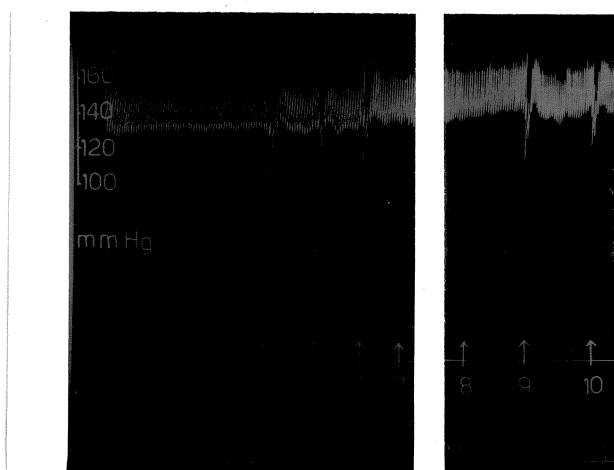
Hexametônio - (3 mg/kg).

- 1 - Liberação pela peçonha (Tyrode com excesso de magnésio).
- 2 - Liberação pela peçonha (Tyrode com excesso de magnésio)
- 3 - Liberação pela peçonha (Tyrode com excesso de magnésio)
- 4 - Liberação pela peçonha (Tyrode com excesso de magnésio)
- 5 - 4 ng de acetilcolina
- 6 - 2 ng de acetilcolina
- 7 - Liberação pela peçonha (Tyrode com excesso de magnésio e de cálcio)
- 8 - 2 ng de acetilcolina
- 9 - Liberação pela peçonha (Tyrode com excesso de magnésio e de cálcio)
- 10 - 3 ng de acetilcolina
- 11 - Liberação pela peçonha (Tyrode com excesso de magnésio e de cálcio).
- 12 - Liberação pela peçonha (Tyrode com excesso de magnésio e de cálcio), após atropinização (1 mg/kg).
- 13 - 3 ng de acetilcolina

FIGURA 8

DOSAGEM, EM GATO, DA ACETILCOLINA LIBERADA PELA PEÇONHA DE ESCORPIÃO NO DIAFRAGMA INERVADO DE RATO

(Influência da neomicina)



Gato ♂ - 1.450 gramas.

Anestésico - pentobarbital sódico (30 mg/kg).

Heparina - (0,5 ml de Liquemine "Roche").

Efedrina - (1 mg/kg).

Hexametônio - (3 mg/kg).

- 1 - Liberação espontânea
- 2 - Liberação pela peçonha (Tyrode com neomicina)
- 3 - Liberação pela peçonha (Tyrode com neomicina)
- 4 - Liberação pela peçonha (Tyrode com neomicina e excesso de cálcio)
- 5 - 2 ng de acetilcolina
- 6 - Liberação pela peçonha (Tyrode com neomicina e excesso de cálcio)
- 7 - Liberação pela peçonha (Tyrode com neomicina e excesso de cálcio), após alcalinização e fervura
- 8 - 2 ng de acetilcolina, após alcalinização e fervura
- 9 - 2 ng de acetilcolina, após acidificação e fervura
- 10 - Liberação pela peçonha (Tyrode com neomicina e excesso de cálcio), após acidificação e fervura

TABELA III

Influência do íon magnésio e da neomicina sobre a liberação de acetilcolina provocada pela peçonha de Tityus serrulatus do diafragma de rato

Liberação em Tyrode com excesso de magnésio antes e após a adição de excesso de cloreto de cálcio		Liberação em Tyrode com neomicina antes e após a adição de cloreto de cálcio	
Tyrode com excesso de magnésio (*)	Tyrode com excesso de magnésio (*) e de cálcio (***)	Tyrode com neomicina (**)	Tyrode com neomicina (**) e excesso de cloreto de cálcio (***)
0,0	57,50	0,0	60,00
0,0	60,00	0,0	57,50
0,0	60,00	0,0	57,50
-	-	0,0	55,00
-	-	0,0	57,50
0,0	59,17 ± 0,83	0,0	57,50 ± 0,79

(*) - 40 mg/ml de Cl_2 mg

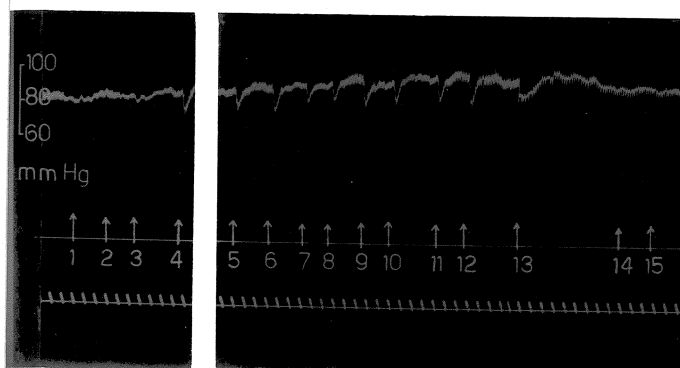
(**) - 40 mg/ml de sulfato de neomicina

(***) - 160 mcg/ml de $CaCl_2$

FIGURA 9

DOSAGEM, EM GATO, DA ACETILCOLINA LIBERADA PELA PEÇONHA DE ESCORPIÃO DO DIAFRAGMA INERVADO DE RATO

(Influência da d-tubocurarina)



Gato 0 - 800 gramas
Anestésico - pentobarbital sódico (30 mg/kg)
Heparina - (0,5 ml de Liquemine "Roche")
Efedrina - (1 mg/kg)
Hexametônio - (3 mg/kg)

- 1 - Liberação espontânea
- 2 - Liberação espontânea
- 3 - 0,5 ng de acetilcolina
- 4 - 3 ng de acetilcolina
- 5 - 3 ng de acetilcolina
- 6 - Liberação pela peçonha (Tyrode com dTc)
- 7 - 2 ng de acetilcolina
- 8 - 2 ng de acetilcolina
- 9 - Liberação pela peçonha (Tyrode com dTc)
- 10 - 3 ng de acetilcolina
- 11 - Liberação pela peçonha (Tyrode com dTc)
- 12 - 4 ng de acetilcolina
- 13 - Atropina (1 mg/kg do gato)
- 14 - 3 ng de acetilcolina
- 15 - Liberação pela peçonha (Tyrode com dTc)

TABELA IV

Influência da procaina e da d-tubocurarina sobre a liberação de acetilcolina provocada pela peçonha de Tityus serrulatus, do diafragma de rato

Liberação em Tyrode com procaina antes e após a adição de cloreto de cálcio		Liberação em Tyrode com procaina e após lavagem da preparação e adição de Tyrode sem procaina		Liberação em Tyrode com d-tubocurarina - (**)
Tyrode com procaina (*)	Tyrode com excesso de cloreto de cálcio (***)	Tyrode com procaina (*)	Tyrode sem procaina	
0,0	0,0	0,0	65,00	82,50
0,0	0,0	0,0	50,00	52,50
-	-	0,0	62,50	40,00
0,0	0,0	0,0	59,16 ± 4,63	75,00
				72,50
				64,50 ± 7,88

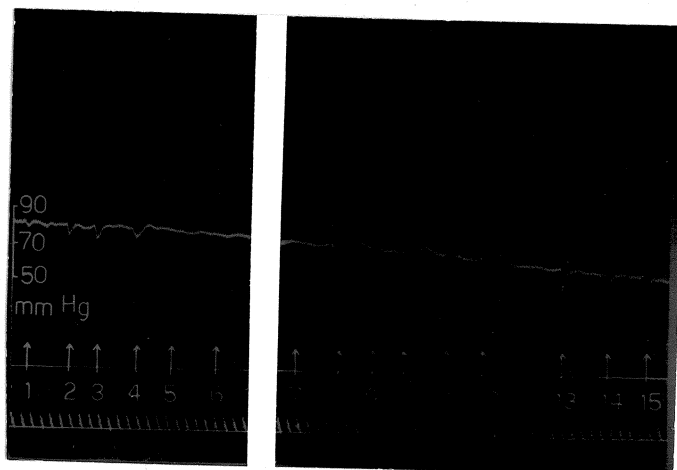
(*) - 400 mcg/ml de cloridrato de procaina

(**) - 3 mcg/ml de cloreto de d-tubocurarina

(***) - 160 mcg/ml de CaCl_2

FIGURA 10

DOSAGEM, EM GATO, DA ACETILCOLINA LIBERADA PELA PEÇONHA DE ESCORPIÃO NO DIAFRAGMA INERVATO DE RATO (Influência da procaina)



Gato [↑]0 - 1.100 gramas.

Anestésico - pentobarbital sódico (30 mg/kg).

Heparina - (0,5 ml de Lique mine "Roche").

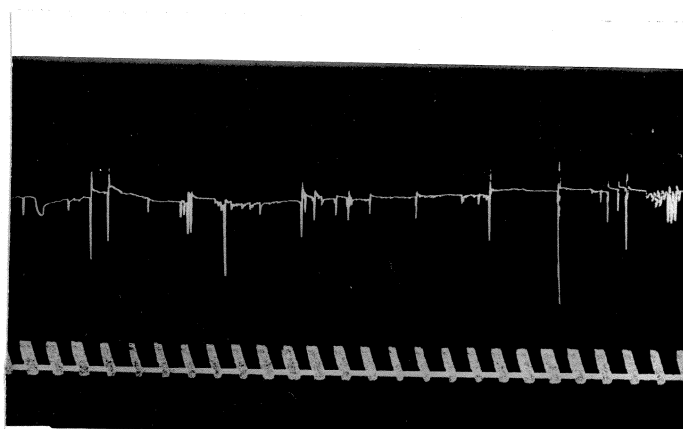
Efedrina - (1 mg/kg).

Hexametônio - (3 mg/kg).

- 1 - Liberação espontânea
- 2 - 1 ng de acetilcolina
- 3 - 2 ng de acetilcolina
- 4 - 2 ng de acetilcolina
- 5 - Liberação pela peçonha (Tyrode com procaina)
- 6 - Liberação pela peçonha (Tyrode com procaina e adição de 160 mcg/ml de CaCl_2)
- 7 - Liberação pela peçonha (Tyrode com procaina)
- 8 - Liberação pela peçonha (Tyrode normal)
- 9 - 2 ng de acetilcolina
- 10 - 3 ng de acetilcolina
- 11 - 2 ng de acetilcolina
- 12 - 3 ng de acetilcolina
- 13 - Liberação pela peçonha (Tyrode normal)
- 14 - 2,5 ng de acetilcolina
- 15 - Liberação pela peçonha (Tyrode normal)

FIGURA 11

AÇÃO DA PEÇONHA DE ESCORPIÃO SÔBRE O DIAFRAGMA INERVADO DE RATO

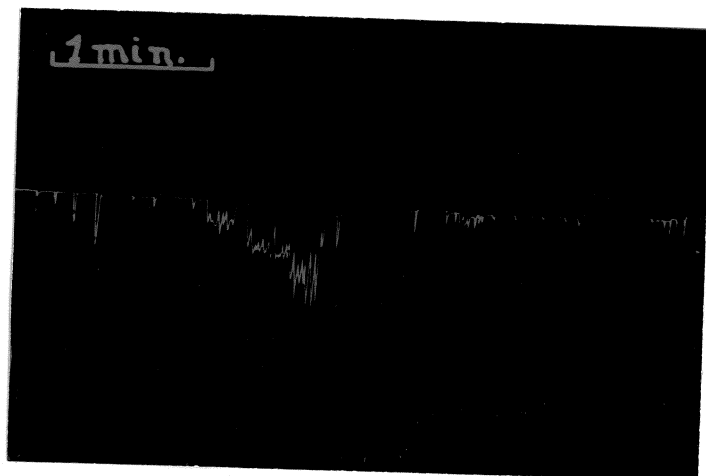


Tyrode com excesso de CaCl_2 (400 mg/l)

Tempo: 10 em 10 segundos

FIGURA 12

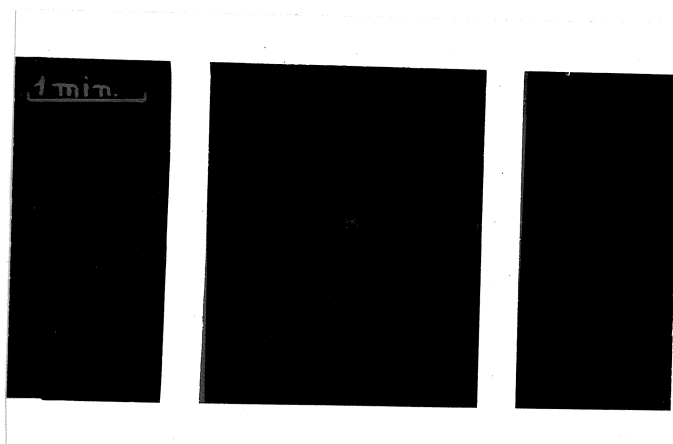
AÇÃO DA PEÇONHA DE ESCORPIÃO SÔBRE O DIAFRAGMA INERVADO DE RATO



Tyrode com concentração usual de CaCl_2 (200 mg/l)

FIGURA 13

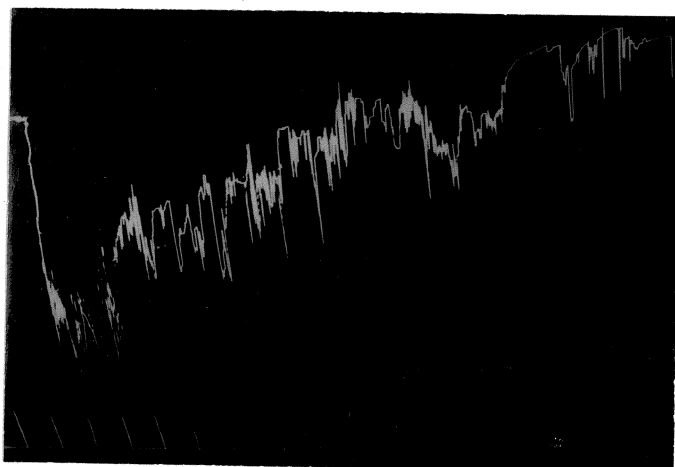
AÇÃO DA PEÇONHA DE ESCORPIÃO SÔBRE O DIAFRAGMA INERVADO DE RATO



Tyrode com concentração usual de CaCl_2
(20 mg/l)

FIGURA 14

AÇÃO DA PEÇONHA DE ESCORPIÃO SÔBRE O ÍLEO ISOLADO DE COBAIA



Tyrode com concentração usual de CaCl_2 (200 mg/l)

4 - DISCUSSÃO

A peçonha escorpiônica, incubada com diversos tecidos inervados, causou a liberação de substância farmacologicamente ativa, cuja existência foi evidenciada pela propriedade de produzir queda abrupta e fugaz da pressão arterial do gato. Tal liberação revelou-se também pelo efeito farmacológico desencadeado no órgão liberador, isto é, contração do músculo diafragma e do íleo da cobaia.

Diante dessas verificações, várias questões apresentaram-se como temas de investigação. Na presente pesquisa, realizaram-se experiências para caracterizar os aspectos mais gerais do problema, pois o campo de investigação é vasto, sendo impossível abrangê-lo em todos os seus aspectos em um só trabalho.

A preocupação inicial foi a de determinar a natureza e origem do princípio liberado pela peçonha. A substância - mostrou-se capaz de causar hipotensão e deu lugar ao aparecimento de contrações em músculos estriados e liso, manifestações essas que se situam no quadro de estimulação de receptores colinérgicos. A suposição de que o princípio liberado atue através de combinação com estes receptores é demonstrada, de um lado, pela abolição do efeito hipotensor pela atropina, de outro, pela supressão das contrações do diafragma pela d-tubocurarina. - Por outro lado, o princípio hipotensor somente pôde ser revelado quando a neostigmina era adicionada ao líquido de incubação. Este resultado indica claramente que o princípio liberado é um éster da colina, pois a sua destruição é impedida pelo agente

anticolinesterásico. Trata-se de um éster da colina com propriedades semelhantes às da acetilcolina quer pela fugacidade de seu efeito na pressão arterial, quer por sua resistência à fervura em meio ácido, quer por sua termolabilidade em meio alcalino.

As verificações acima enumeradas permitem concluir - que a substância liberada é um éster da colina e, com muita probabilidade a própria acetilcolina. Contudo, para identificar definitivamente a substância liberada, como sendo a acetilcolina, tornam-se necessárias outras provas a serem realizadas em pesquisa posterior como, por exemplo, a comparação de sua atividade farmacológica com a da acetilcolina em várias preparações, - procedimento utilizado por FELDBERG e GADDUM (1934) na identificação da substância liberada pelo gânglio cervical superior do gato pela estimulação elétrica pré-ganglionar. Além de ensaios quantitativos paralelos, seria necessário para a perfeita identificação do ou dos princípios colinomiméticos liberados pela peçonha o emprêgo de métodos físico-químicos. Entretanto, os dados obtidos no presente trabalho apresentam a acetilcolina como o éster de colina que, com maior probabilidade, constitui a substância liberada. Reforça esta hipótese o fato de esta substância ter a sua origem nas terminações nervosas.

De fato, as experiências realizadas permitem estabelecer as terminações nervosas como a origem do princípio liberado pela peçonha escorpionica, pois, o líquido nutriente contendo a peçonha após banhar uma estrutura desnervada não alterou a pressão arterial do gato. O mesmo aconteceu, quando o líquido nutriente, que banhava o diafragma innervado, encerrava, além da neostigmina e da peçonha, drogas que sabidamente atuam nas ter-

minações nervosas, impedindo a liberação do mediador colinérgico.

Uma das constatações mais interessantes e importantes do ponto de vista farmacológico, feitas na presente pesquisa, é a de que os caracteres da liberação provocada pela peçonha e pelos impulsos nervosos são idênticos. Com efeito, HARVEY e MACINTOSH (1940) assim como HUTTER e KOSTIAL (1954) verificaram que o íon cálcio é indispensável para que haja liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos. Ora, na presente pesquisa, verificou-se que, em ausência de cálcio ou quando o seu teor é baixo, a peçonha não promove a liberação de acetilcolina. Por outro lado, o magnésio inibe a liberação da acetilcolina pelos impulsos, segundo demonstraram, de um modo indireto, DEL CASTILLO e ENGBAECK (1954). Na presente pesquisa, constatou-se que o magnésio também inibe a liberação de acetilcolina provocada pela peçonha. O cálcio antagoniza o bloqueio neuromuscular provocado pelo magnésio por mecanismo pré-juncional. DEL CASTILLO e KATZ (1954) sugeriram mesmo que o magnésio atue deslocando o cálcio de composto, que opere, como intermediário, durante a liberação do mediador pelos impulsos nervosos, isto é, estes íons atuariam como antagônicos competitivos no processo de liberação da acetilcolina. No que diz respeito à liberação da acetilcolina pela peçonha, demonstrou-se o mesmo antagonismo cálcio-magnésio. Os antibióticos do grupo da estreptomicina produzem bloqueio neuromuscular que apresenta caracteres idênticos aos do provocado pelo magnésio (VITAL BRAZIL e CORRADO, 1957, CORRADO e RAMOS, 1958, CORRADO e RAMOS, 1960, VITAL BRAZIL et al, 1961). O íon cálcio antagoniza o bloqueio produzido por êsses antibióticos como o faz relativamente ao provocado pelo magnésio. Na

realidade êsses antibióticos atuam no mecanismo de transmissão neuromuscular como o magnésio (ELMQVIST e JOSEFSSON, 1962). Ora, segundo se verificou nesta pesquisa, a neomicina inibe a liberação de acetilcolina provocada pela peçonha e o cálcio é capaz de antagonizar êsse efeito. Finalmente a procaina, que impede a liberação da acetilcolina pelos impulsos nervosos (HARVEY, 1939, STRAUGHAN, 1961), também o faz relativamente à liberação da provocada pela peçonha. Será importante, para confirmar a identidade de ambos os processos, do ponto de vista farmacológico, estudar, em ulterior pesquisa, a influência do hemicolinio nº 3 e da toxina botulínica, na liberação de acetilcolina produzida pela peçonha.

No envenenamento produzido pela peçonha escorpiônica, observam-se efeitos de estimulação colinérgica tais como profusa secreção salivar e lacrimal, sudorese, bradicardia, diarreia, micturição voluntária e involuntária, assim como de estimulação motora (tremores musculares). A ação liberadora de acetilcolina exibida pela peçonha escorpiônica, participa, inquestionavelmente, na gênese dêsses distúrbios.

O método utilizado no presente trabalho mostrou-se bastante adequado para a investigação "in vitro" da liberação de mediadores químicos do sistema nervoso autônomo e das influências exercidas pelas drogas sobre essa liberação. É possível que o método possa ser estendido ao estudo da liberação de mediadores do sistema nervoso central.

oooOooo

5 - RESUMO E CONCLUSÕES

1 - A peçonha de Tityus serrulatus, quando incubada - com o diafragma de rato, o íleo da cobaia ou o gânglio celíaco do gato, é capaz de liberar, desses tecidos, um princípio hipotensor que foi identificado como sendo um éster da colina, com muita probabilidade, a própria acetilcolina.

2 - Esta substância provém das terminações nervosas - colinérgicas, pois ela não apareceu quando se empregaram estruturas desnervadas (diafragma desnervado de rato).

3 - A liberação de acetilcolina causada pela peçonha assemelha-se à que decorre da estimulação dos nervos colinérgicos. Assim o íon magnésio, a neomicina e a procaina, agentes capazes de inibir a liberação do mediador colinérgico, promovida pelos impulsos nervosos, impedem também a liberação provocada - pela peçonha escorpiônica. Por outro lado, o íon cálcio é, em ambos os casos, indispensável para que a liberação possa ocorrer.

4 - A ação liberadora de acetilcolina explica, em parte, os efeitos de estimulação colinérgica e motora observados - no envenenamento produzido pela peçonha escorpiônica.

oooOooo

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAZIL, V - Contribuição ao estudo do envenenamento pela picada do escorpião e seu tratamento. Collectanea de Trabalhos do Instituto Butantan p. 69-81, 1907.
- CARVALHO, P. - Ação dos venenos dos escorpiões brasileiros sobre o sistema nervoso vegetativo. Arq. Inst. Batista, Rio de Janeiro, 3, nov. 1937.
- CASTILLO, J. Del & ENGBAECK, L - Nature of neuromuscular block produced by magnesium. J. Physiol., 124: 370, 1954.
- CASTILLO, J. Del & KATZ, B. - The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. J. Physiol., 124: 533, 1954.
- CORRADO, A.P. & RAMOS, A.O. - Neomycin - its curariform and ganglioplegic actions. Rev. Brasil. Biol., 18: 81, 1958.
- CORRADO, A.P. & RAMOS, A.O. - Some pharmacological aspects of a new antibiotic - kanamycin. Rev. Brasil. Biol., 20: 43, 1960.
- DINIZ, C.R. - Mecanismo de ação de um componente tóxico do veneno de escorpião. In: Charles Edward Corbett, Elementos de Farmacodinâmica, p. 651-669 - São Paulo, Fundo Editorial Prociencx, 1964.

- ELMQVIST, D. & JOSEFSSON, J.O. - The nature of the neuromuscular block produced by neomycin. Acta Physiol.Scand. - 54: 105, 1962.
- FELDBERG, W. & GADDUM, J.H. - J.Physiol. (Lond) 81: 305, 1934. In J.Harold Burn, The autonomic nervous system. Oxford, - Blackwell Scientific Publications.
- GUYON, M. - Du danger pour l'homme de la piqûre du grand Scorpion du Nord de l'Afrique (*Androctonus funestus* Hemprich et Ehrenberg), C.R.Ac. des Sc., 59: 533, 1864.
- HARVEY, A.M. & Mac INTOSH, F.C. - Calcium and synaptic transmission in a sympathetic ganglion. J.Physiol., 97: 408, - 1940.
- HOUSSAY, B.A. - Action physiologique du venin des scorpions - (*Buthus quinquestriatus* et *Tityus bahiensis*). J.Physiol et pathol. gén., 18: 305-317, 1919.
- HUTTER, O.F. & KOSTIAL, K. - Effect of magnesium and calcium ions on release of acetylcholine. J.Physiol., 124: 234, 1954.
- POZO, E.C. DEL - Mechanism of pharmacological actions of scorpion venoms. In: Eleanor E. Buckley & Nandor Porges, - Venoms, p. 123-129. (Publication for the Advancement of Science, Washington, D.C., 1956).

- RAMOS, A.O.; CORRADO, A.P. - Efeito hiperpiético do veneno de escorpião (Tityus bahiensis e Tityus serrulatus). An. Fac.Med.Univ.S.Paulo, 28(2): 81-98, 1954.
- STRAUGHAN, D.W. - The action of procaine at the neuromuscular - junction. J.Pharmacol., 13: 49, 1961.
- VITAL BRAZIL, O.; CORRADO, A.P. - The curariform action of - streptomycin. J.Pharmacol. & Exper.Therap., 120: 452, 1957.
- VITAL BRAZIL, O., et al - Viomycin - pharmacological actions - on myoneural junction ganglionic synapse and smooth muscle. Chemotherapia, 3: 521, 1961
- VITAL BRAZIL, O. - Ação neuromuscular da peçonha de Micrurus. - Tese - Fac.Med., São Paulo. (Publicado in: "O Hospi-tal", 68(4): 910-950, 1965).

oooOooo