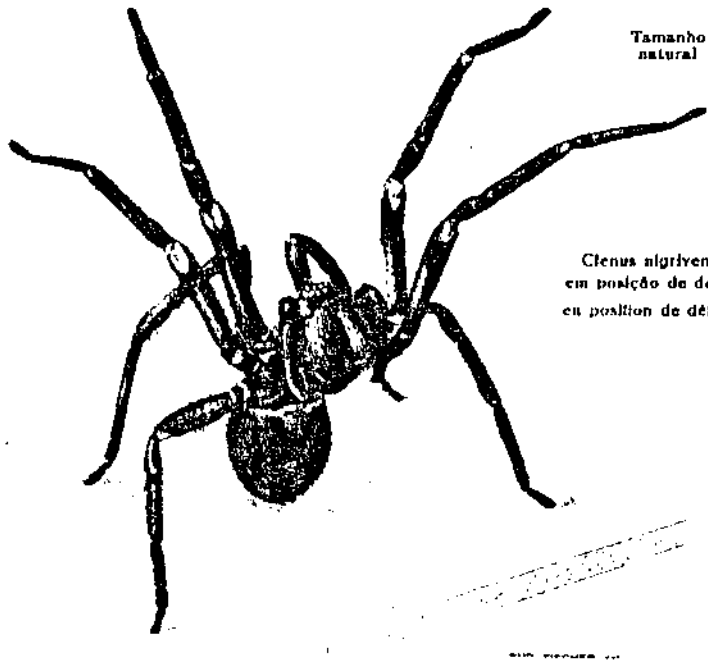
Q1930

MARCOS DIAS FONTANA

"MODO DE AÇÃO DA PEÇONHA DE Phoneutria nigriventer NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E NO MÚSCULO ESQUELÉTICO"



Brazil, V. e Vellard, J, (1925)

ORIENTADOR: Prof. Dr. OSWALDO VITAL BRAZIL

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

1.982

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

"OS DIAS PRÓSPEROS NÃO VEM POR ACASO,
NASCEM DE MUITA FADIGA E MUITOS MO-
MENTOS DE DESALENTO"

(anonimo)

Aos meus pais

À Maria Victoria

Aos meus filhos

Fernando e Renato

AGRADEÇO:

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

ao Dr. Aquiles Piedrabuena, pelo inestimável auxilio na execução das analises estatisticas;

às Dras. Julia Prado Franceschi e Lea Rodrigues Simioni pelo apoio oferecido durante todo o curso de pós-graduação;

ao Engenheiro Darcio de Almeida Amaral pelas sugestões e auxilio na fase experimental;

ao Gildo Bernardo Leite, técnico do laboratório do Departamento de Farmacologia, pela incansável e eficiente ajuda na montagem das experiências;

à Marilce Baltazar dos Santos e Maria Nelma da Silva pela datilografia e colaboração nas diferentes etapas deste trabalho;

ao Nadim Farah Heluany, Solange Aparecida dos Santos Basso, Maria Rita de Lima, Adilson José Thomas, Antonio Wilson dos Santos, Joaquim Francisco do Prado, José Ramos Bandeira e Claudinei Aparecido da Silva Martinez, pelos serviços técnicos e auxiliares cuja contribuição foi de grande valor na elaboração deste trabalho;

à Mariângela Pisoni, pela cuidadosa revisão das referências bibliográficas.

I N D I C E

I - INTRODUÇÃO 1

II - OBJETIVOS E IMPORTÂNCIA DA PESQUISA 3

III - ARANEISMO 4

IV - MATERIAL E MÉTODOS 20

IV - 1. Preparação Nervo Frênico Diafragma de Rato .. 20

1.1. Liberação de Acetilcolina 21

1.2. Estudo do Potencial de Repouso, Placa Terminal em Ministura, Potencial de Placa Terminal e Potencial de Ação. 23

1.2.1. Potencial de Repouso (P. R.) 26

1.2.2. Potencial de Placa Terminal em Miniatura (p.p.t.m.) 27

1.2.3. Potencial de Placa Terminal (p.p.t.) 27

1.2.4. Potencial de Ação 27

2. Preparação Hemidiafragma cronicamente desnervado do rato. 28

V - PEÇONHA DE Phoneutria nigriventer 29

VI - DROGAS UTILIZADAS 31

VII - RESULTADOS 32

VII- 1. Preparação Nervo-Frênico Diafragma de Rato . 32

1.1. Liberação de Acetilcolina 48

1.2. Potencial de Repouso 48

1.3. Potencial de Placa Terminal em Miniatura (p.p.t.m.) 50

1.4. Potencial de Placa Terminal (p.p.t)..... 64

1.5. Potencial de Ação 64

2. Preparação Hemidiafragma Cronicamente Desnervado do Rato..... 64

VIII - DISCUSSÃO 75
IX - CONCLUSÕES 81
X - RESUMO 82
XI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 84

I - INTRODUÇÃO

VITAL BRAZIL e VELLARD (1925, 1926) foram os primeiros a realizarem estudos experimentais sobre a peçonha da aranha armadeira (Phoneutria nigriventer, Ph.keyserling). Registraram sua elevada toxicidade e descreveram com exatidão os sinais e sintomas que produz em várias espécies animais (camundongos, ratos, cobaias, pombos, coelhos e sapos), tanto por picada direta, como por injeção de solutos de veneno. Assinalaram manifestações de intensa dor local, forte agitação, tremores musculares, movimentos convulsivos intermitentes, exagerada excitabilidade, convulsões do tipo tônico, salivação abundante, diarréia e paralisia. Prepararam o antiveneno específico e desenvolveram processo de avaliação da sua atividade neutralizante. Verificaram ainda que a peçonha não exerce atividades coagulante e proteolítica. Dignos também de registro são as pesquisas de BÜCHERL (1953) sobre processos de extração da peçonha sem sacrifício das aranhas e a determinação da dose mediana letal do veneno em camundongos. BARRIO (1955) pesquisou os efeitos da peçonha em ratos não anestesiados, na preparação in situ nervo ciático-músculo gastrocnêmio do rato e na preparação isolada rectus abdominis do sapo. Confirmou nos primeiros os sinais e sintomas de envenenamento descritos por VITAL BRAZIL e VELLARD. Com o emprego da preparação ciático-gastrocnêmio verificou alguns efeitos neuromusculares, tais como retardo na descontração e aumento da amplitude das respostas do músculo à estimulação do nervo, fibrilações e perda da excitabilidade indireta e, a seguir, da direta. Assinalou também que a peçonha é capaz de antagonizar o bloqueio neuromuscular produzido pelo curare. No rectus abdominis verificou sensibilização aos íons potássio e bário. SCHENBERG e PEREIRA LIMA (1966) empregaram vários processos (precipitação pelo sulfato de amônio, eletroforese, filtração em Sephadex, separação em coluna de troca iônica) para separar as toxinas da peçonha. Constataram que são polipeptídeos básicos com peso molecular de 5000 a 6000 daltons, portanto, toxinas polipeptídicas como, por exemplo, as neuro-

toxinas das peçonhas escorpiônicas. Procuraram identificar os componentes responsáveis pela toxicidade e pelos vários efeitos causados pelo veneno tais como sialorréia, priapismo, paralisia espástica, paralisia flácida, contração do íleo de cobaia e hipotensão.

Nenhuma dessas pesquisas, entretanto, abordou o estudo do modo de ação da peçonha e o seu mecanismo de ação.

II - OBJETIVOS E IMPORTÂNCIA DA PESQUISA

A presente pesquisa teve por objetivo esclarecer o ou os mecanismos de ação da peçonha da aranha armadeira no organismo animal. Para tal finalidade utilizaram-se as preparações isoladas nervo-frênico diafragma do rato e hemidiafragma cronicamente desnervado deste animal e a peçonha da espécie Phoneutria nigriventer. O conhecimento do modo de ação dos venenos e/ou de suas toxinas, além de apresentar interesse puramente especulativo, pode assumir importância do ponto de vista prático. Assim, hoje em dia, já são numerosos os venenos animais e suas toxinas utilizadas para esclarecer, principalmente em nível molecular, fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos assim como o modo de ação de drogas. São por exemplo, importantes instrumentos de pesquisa as neurotoxinas pós-sinápticas ofídicas, a tetrodotoxina e a saxitoxina , a peçonha das aranhas do gênero Latrodectus, as toxinas escorpiônicas, a batracotoxina, a histrionicotoxina e muitas outras. Além disso, o conhecimento de como atua um veneno ou peçonha poderá abrir novos horizontes na compreensão da fisiopatologia da intoxicação ou envenenamento a que dá lugar, a sugerir a instituição de medidas eficazes em seu tratamento. A aranha armadeira é a principal responsável pelos acidentes aranefdicos em nosso Estado. O conhecimento do modo de ação de sua peçonha oferece, pois, particular interesse. Para bem situarmos a importância e natureza dos acidentes causados pela Phoneutria, faremos, a seguir breve apanhado sobre araneismo, em especial no Brasil.

III - ARANEÍSMO

Os artrópodos compreendem as seguintes classes: ARACHNIDA, CRUSTACEA, ONYCOPHORA E INSECTA. A classe dos aracnídeos abrange dez ordens, dentre as quais as dos SCORPIONES, ARANEIDAE e ACARINAE de importância médica. A ordem dos ARANEIDAE ou Araneidas ou simplesmente das Aranhas constitue um grupo de grande interesse pelo elevadíssimo número de especies e espécimes, pelo inacreditável poder de adaptação às variações de ambiente e, por existirem aranhas cuja picada e inoculação de veneno podem causar acidentes de gravidade no homem.

É bastante curiosa a evolução das aranhas através das eras geológicas de nosso globo. Existem fósseis que segundo seus descobridores devem possuir bem mais de trezentos milhões de anos de idade. Durante a formação do Carbonífero já havia grande diversificação em espécies. "De então até os nossos dias, durante dezenas e dezenas de milhões de anos, as aranhas evoluíram tão prodigamente que os aracnólogos chegam a calcular o número total de espécies em cerca de 50.000 distribuídas por quase 1000 gêneros e 47 famílias. Muitas espécies recentes são tão férteis, que chegam a produzir anualmente entre um e dois mil ovos, dos quais nascem praticamente todos os filhotes. Se estes vingassem integralmente e se reproduzissem por seu turno, o que está longe de acontecer, teríamos em poucos anos uma camada de aranha de algumas dezenas de metros de espessura a sepultar toda a superfície da terra". (BÜCHERL, 1980).

Poucas espécies são encontradas nas regiões subpolares de ambos os hemisférios, nas tundras e estepes batidos pelos vendavais e nevascas. Quantidades já apreciavelmente maiores existem em países com clima temperado. Sua abundância específica e numérica se avoluma, entretanto, na medida que se progride em direção às regiões de clima de transição, entre o temperado subtropical e deste ao tropical. "Calcularam os aracnólogos que em certas regiões existiriam duas aranhas por metro quadrado com distribuição não somente horizontal mas também

vertical. Vivem sobre árvores, arbustos e flores, na grama, no próprio chão, dentro de fendas que as chuvas ou raízes dos vegetais abrem, dentro do solo, em túneis, escavações ou mesmo dentro de buracos nos troncos de árvores. Em realidade somos rodeados de todos os lados por aranhas". (BÜCHERL, 1980).

A imensa maioria passa sua vida completamente despercebida pelo homem, atingindo apenas 1 e 2 milímetros de comprimento. Considerável número de espécies alcança entre 5 e 12 milímetros. Relativamente poucas superam os 30 e apenas cerca de 250 espécies, quase todas caranguejeiras tropicais e subtropicais medem entre 60 e 90 milímetros de comprimento de corpo. Quanto ao habitat distingue-se aranhas terrícolas, cavernícolas, errantes, "domésticas", adaptadas à vida subaquática ou vivendo à margem das águas. Todas são carnívoras. Alimentam-se essencialmente de artrópodos, especialmente de insetos. Praticam a adelfofagia (comer irmãos) e até mesmo a androfagia (comer o macho após acasalamento). Algumas, principalmente as caranguejeiras podem ainda alimentar-se de lagartixas, pequenos mamíferos e filhotes de pássaros (Avicularia).

Para se apoderarem da presa, usam dois processos fundamentais totalmente diferentes. O primeiro consiste em caçar a vítima; quando dela estão perto, ao alcance do pulo, saltam sobre a mesma cravam-lhe as duas pinças venenífera s. Estas aranhas não constroem teias; são quase sempre errantes e costumam andar sozinhas. O segundo método é a captura da presa por meio de uma teia, dependurada entre galhos de árvores silvestres ou frutíferas, nos cantos das janelas, etc.. A peçonha é, entretanto, também empregada para matar a presa.

Todas as aranhas são peçonhentas, salvo as da pequena família Uloboridae, cuja função venenosa secundariamente desapareceu. Contudo, muito poucas causam acidentes no homem e nos animais domésticos. Pertencem às duas principais sub-ordens dos ARANEIDAE, Orthognata e Labidognata.

A - Sub-ordem Orthognata ou Mygalomorfas.

Nesta sub-ordem uma das principais características é a maneira de como as quelíceras se articulam em relação ao eixo longitudinal do corpo. São "paralelodontes" ou

"paraxiais". Picam portanto, verticalmente (de cima para baixo ou de trás para diante). As glândulas venenîferas ao contrário das da Labidognata, encontram-se dentro do artículo basal das próprias quelíceras. Esta sub-ordem abrange mais de (1000) espécies.

Os membros deste gênero são médios ou grandes. Não constroem teias complexas. Algumas espécies habitam com certa frequência buracos escavados no solo, os quais são muitas vezes cobertos com fios de seda enquanto outras em aberturas onde constroem uma simples teia. A maioria é constituída de formas errantes. Suas presas são insetos e miríapodes, ocasionalmente pequenos vertebrados. VITAL BRAZIL e VELLARD (1926) observaram que algumas caranguejeiras em cativeiro alimentam-se de ofídios. Aceitam também camundongos jovens, sem pelos e até mesmo pedaço de carne. (BÜCHERL, 1980).

Esta sub-ordem é usualmente subdividida em 8 famílias. Dessas, as que tem interesse como possíveis causadoras de acidentes pertencem às famílias Theraphosidae e Diplu ridae.

Família Theraphosidae: Esta família possui representantes em todo mundo, mas principalmente na América do Sul. É constituída de aranhas errantes e predadoras. Quase todas são mansas com exceção das da sub-família Theraphosinae. O seu veneno é, regra geral, pouco potente, exceçaõ feita ao das Theraphosinae que, segundo VELLARD (1936), podem causar acidentes fatais tanto no homem como em cavalos, bois e cães. No entanto, BÜCHERL, (1980) afirma não conhecer nenhum caso documentado no Brasil de acidente fatal no homem. VELLARD (1936), transcreve em sua obra "Le venin des Araignées" observação de acidente fatal causado por aranha do gênero Phormictopus, a qual resumimos a seguir. A vítima, mulher robusta de 36 anos, foi picada na face interna do terço superior do antebraço esquerdo ao vestir a sua roupa que estivera dependurada em uma das paredes da cabana. A aranha tombou no solo, sendo esmagada, razão pela qual a espécie não pode ser identificada. Logo a seguir, dores violentas no braço que, dentro em pouco, começou a inchar.

Após 24 horas a dor persistia e um vasto edema e flictenas invadiam todo o braço e antebraço. A paciente apresentava ainda icterícia, febre e hamatúria. No 4º dia, febre de 39ºC, pulso filiforme, respiração difícil e lenta, ligeira cianose da face e extremidades. O braço picado estava enorme, lívido, com estrias violáceas; duas flictenas haviam-se rompido, deixando pequenas úlceras. A urina desde o 2º dia apresentava cor de café ou de sangue venoso. A paciente faleceu na noite do 4º para o 5º dia.

Apesar da discordância sobre a existência de casos fatais, extremamente raros, não se pode por em dúvida que as Theraphosinae são capazes de causar acidentes de certa gravidade no homem. Outro tipo de acidentes a que algumas Theraphosidae podem dar lugar prende-se à existência de pelos urticantes muito finos no abdome e na face interna das patas, facilmente destacáveis. Em contacto com a pele humana produzem grande desconforto *, placas de eritema e pústulas esbranquiçadas; esta erupção pode generalizar-se e durar de 5 a 6 dias (VELLARD, 1936). Quando uma dessas aranhas se sente ameaçada, ergue o abdome e o esfrega com as patas posteriores. Solta-se, então, uma nuvem de pelos que atinge uma certa distância, podendo produzir processo inflamatório nas vias respiratórias e asfixia em pequenos roedores. (BÜCHERL, 1971).

Estudos experimentais (HOUSSAY, 1916, VITAL BRAZIL E VELLARD, 1926, VELLARD, 1936) mostraram que a peçonha das Theraphosidae causa excitação, torpor e paralisia. É esta, segundo HOUSSAY (1916), decorrente de bloqueio neuromuscular.

---

* "Les Lasiodora et surtout les Acanthoscurria sont particuliérement urticantes; le nom de A. atrox, que j'ai donné à une de ces Mygales, rappelle les sentations cuisantes qu'elle m' afait éprouver en l'étudiant, soit vivante, soi conservée". (VELLARD, 1936).

Além desses efeitos, a das Acanthoscurria, Phormictopus e Pamphobetus pode provocar edema e, às vezes, necrose local. Deve-se registrar que o veneno dessas aranhas não exerce atividades proteolíticas e coagulante. (VITAL BRAZIL e VELLARD, 1926).

Família Dipluridae. As espécies pertencentes a esta família são abundantes no hemisfério sul (neotropical e regiões da Austrália). São construtoras de teias, em geral, extensas. Os gêneros Atrax e Trechona são os mais importantes quanto à toxicidade de seus representantes.

O gênero Atrax foi criado em 1877 por CAMBRIDGE para uma espécie fêmea de A. robustus da região de Sidney (Austrália). Várias espécies tem sido descritas, inclusive com distribuição geográfica bem definida. Além da Austrália são encontradas na Nova Guiné e ilhas Salomão. Em geral, as espécies pertencentes a esse gênero são confinadas à região costeira e montanhas adjacentes. Suas teias são encontradas sobre lenhas, entre pedras e em troncos de árvores. Podem causar acidentes graves, por vezes fatais, tanto nas grandes cidades da Austrália como ao redor das mesmas. Os sintomas observados em camundongos e cobaias provocados pela picada direta são os seguintes: dor, agitação, profusa secreção nasal e salivar, perturbações respiratórias, incordenação motora e convulsões (SUTHERLAND, 1978). A morte é precedida de coma. Fracionando o veneno de Atrax robustus, SUTHERLAND (1972) verificou que a única fração que apresenta toxicidade semelhante à do veneno total (1mg/kg) em macacos, possui p.M em torno de 20.000 daltons. Ao componente ativo desta fração denominou-se atraxotoxina.

Experiências em animal intacto (macaco) com o veneno de A. robustus, mostraram que, tanto por injeção venosa, como por via sub-cutânea, os sinais e sintomas gerais são semelhantes (exceção feita à hipotensão transitória, quando se utilizou a venosa): não reatividade da pupila totalmente dilatada, generalizadas fasciculações musculares, salivação abundante, sudorese e lacrimejamento. Após 2 horas, progressiva hipotensão, associada a períodos de apnéia e morte do animal, apesar de praticada a respiração artificial. (SUTHERLAND,1978).

Em preparações neuro-musculares biventer cervicis de pintainhos a atraxotoxina na concentração de 2 ug/ml produziu contrações espontâneas que persistiram por 30 a 90 minutos. Durante esta fase, a estimulação indireta causou aumento da amplitude das respostas musculares. Nesta mesma preparação foram estudadas interações entre a atraxotoxina e algumas drogas. Tanto a galamina como a succinilcolina preveniu parcialmente os efeitos da atraxotoxina. A tetrodotoxina impediu totalmente as contrações espontâneas, assim como o fez também baixo teor em cálcio (0,01 mM) ou elevado em magnésio (10 mM), na solução nutritiva. O fato de a tetrodotoxina antagonizar as contrações espontâneas sugere que atue ativando o canal do sódio das membranas excitáveis.

Em todos os acidentes fatais ocorridos no homem as aranhas foram identificadas como sendo machos da Atrax robustus. Estes acidentes ocorreram em raio de aproximadamente 180 kilômetros de Sidney (GRAY e SUTHERLAND, 1978). Entre os sinais e sintomas observados há referência a dor extrema. Deve-se atribuí-la não só ao trauma causado pelas grandes quelíceras da aranha como também e principalmente à ativação dos canais do sódio da membrana de fibras sensitivas pela peçonha. Esta dor pode prolongar-se por horas e mesmo dias, sem que ocorra nenhuma necrose no local. (SUTHERLAND, 1978).

O gênero Trechona tem vários representantes na America do Sul. O principal é a Trechona venosa. São aranhas muito agressivas, que vivem nas bordas das florestas, longe dos lugares nos quais o homem percorre ou trabalha. Não migram. São noturnas ou "crepusculares", cavoucam o chão e passam a maior parte de sua vida isoladas. Tecem suas teias em forma de funis, de alvura invejável, residindo na parte mais central. Os sinais e sintomas do envenenamento causado por esta espécie em camundongos são: manifestação de dor intensa na região da injeção da peçonha, tremores, salivação, emissão de urina, tetania com paroxismos, movimentos respiratórios espasmódicos e coma. (VITAL BRAZIL e VELLARD, 1925).

B - Sub-ordem Labidognata ou Araneomorfas.

As aranhas incluídas nesta sub-ordem, ao contrário das Orthognatas, possuem quelíceras com articulação diaxial, picando horizontalmente, isto é, de fora para dentro. As glândulas de veneno nas Araneomorfas localizam-se dentro da porção anterior do cefalotórax. Algumas Labidognatas apresentam grande importância médica pois são responsáveis pela maioria de acidentes de araneismo no homem. Dentre as várias famílias que compõem esta sub-ordem, destacam-se do ponto de vista da frequência e/ou da gravidade dos acidentes as Theridiidae, Scytodidae, Lycosidae e Ctenidae.

Família Theridiidae. A primeira descrição da aranha Latrodectus foi feita por ROSSI (1790) na Universidade de Pisa, que a denominou Aranha 13 guttata, sendo posteriormente incluída no gênero Latrodectus. Foi também o mesmo autor que primeiramente relacionou a picada desta espécie de aranha com a síndrome de latrodectismo, a qual, por muito tempo foi confundida com a forma histérica denominada de "tarantismo" (BETTINI e MAROLI, 1978), atribuído pelo vulgo à picada de outra aranha, a tarântula (Lycosa tarêntula).

A sistemática do gênero Latrodectus é muito controvertida. LEVI (1958) sugere que o número de espécies seja agrupado em cinco; Latrodectus mactans, L. geometricus, L. curacaviensis, L. hystrix e L. pallidus. Entretanto, após exaustiva revisão do gênero, o mesmo LEVI (1959) adicionou mais uma espécie, a Latrodectus dahli.

Todos os membros desta família constroem teias simples e tridimensionais, as quais são presas na vegetação ou parcialmente ocultas sob pedras. Capturam presas que usualmente são maiores que elas próprias. Os alimentos principais são: Orthopteros e Coleopteros. No entanto lagartixas, escorpiões e até filhotes de camundongos com cerca de 10 gramas foram observados pendentes na teia dessas aranhas. (BÜCHERL,1980) São aranhas pequenas, os exemplares maiores mal atingem 1 centímetros de comprimento. As pernas e cefalotórax são negros; seu abdomem é grande, quase esférico, com manchas vermelhas em forma de ampulheta. (BÜCHERL, 1980). Não tem pelos visíveis. Os machos chegam à maturidade mais cedo do que as fêmeas, a sua sobre

vivência é porém mais curta, chegando a 1 ou 2 meses. As fêmeas, no entanto, sobrevivem mais tempo podendo viver por vários meses. Em nenhuma espécie foi confirmado que as fêmeas matam e devoram os machos. A aplicação do termo "viúva" às fêmeas desta família é provavelmente devido ao fato de serem encontradas somente fêmeas nas teias.

A sua distribuição geográfica pode ser assim resumida: Latrodectus mactans e L. geometricus são não somente encontradas nas regiões quentes das Américas, mas também em outros continentes, L. curacaviensis comum nas Américas, L. hystrix nas regiões da Arábia e Yeme, L. pallidus na Palestina, Ásia Menor e Rússia e a L. dahli no Irã. Diferentes espécies e sub-espécies de Latrodectus tem-se adaptado a diferentes habitats.

As fêmeas não são agressivas em relação a grandes animais. Quando perturbadas (uma sombra pode ser suficiente) fogem de suas teias para se proteger. A picada em grandes vertebrados é somente ato extremo de defesa. Isto ocorre quando a aranha é prensada acidentalmente contra a pele, ou em casos de camponeses colherem feixes de trigo, ou transportarem caixas deixadas no campo, etc.. É também comum picada na genitália masculina, uma vez que as teias dessas aranhas são, em algumas regiões (California, E.E.U.U.), construídas em vasos sanitários. O ato de picar não possui nenhuma característica peculiar. As quelíceras são introduzidas na pele por alguns segundos. Quando isto ocorre a musculatura cefalotorácica da aranha se contraí e comprime as glândulas de veneno. O aparato venenoso dos machos é bem menor do que o das fêmeas. Somente estas causam acidentes.

A peçonha atua nas terminações nervosas, liberando maciçamente o neurotransmissor até o seu esgotamento e causando o desaparecimento das vesículas sinápticas. (LONGENAEKER et alii, 1970; CLARK et alii, 1970). Encerra várias proteínas tóxicas. A mais ativa em mamíferos é a alfa-latrotoxina com p.M igual a 130.000 daltons (TZENG e SIEKEVITZ, 1978). No homem, os principais sinais e sintomas são: dor intolerável(mi

algias, artralgias), hiperestesia, agitação, tremores, contrações clônicas, movimentos espasmódicos, principalmente nos membros inferiores, rigidez abdominal, respiração artificial e reflexos exagerados; taquicardia e hipertensão, aumento das secreções (salivar, lagrimal, brônquica), paralisia intestinal e da bexiga, priapismo, ejaculação, excitação psicomotora, alucinação e confusão mental. (HURLBUT e CECCARELLI, 1979).

No Brasil são encontradas as espécies L. mactans, L. geometricus e L. curacaviensis. A presença da primeira foi registrada no Rio Grande do Sul por MELLO LEITÃO (1943). A sua distribuição neste Estado limita-se provavelmente às regiões próximas do Uruguay. Foram encontrados exemplares de L. mactans também em Aquidauna e em Caceres no Mato Grosso. (BUCHERL, 1971). Não são, aparentemente, conhecidos casos de acidentes provocados pela espécie em questão no Brasil. A L. geometricus possui peçonha pouco ativa (BETTINI e CANTORE,1959), embora produza experimentalmente efeitos semelhantes aos causados pela L. mactans. (VITAL BRAZIL e VELLARD, 1926). Não parece ser responsável por acidente no homem e em animais domésticos. OTÍLIO MACHADO (1948) da Seção de Zoologia Médica do Instituto Vital Brazil encontrou a L. curacaviensis* na praia de Itaipu, próxima de Niterói e registrou dois acidentes de mediana gravidade em pescadores da região.

"Em Itaipu a aranha tem vida silvestre, sendo encontrada constantemente escondida sob as ramas da campainha de praia (Ipomoea pescaprae). Segundo as informações fornecidas pelos pescadores é mais frequente nos meses de maio e junho".

"Duas pessoas foram mordidas pela aranha, uma em 1945, outra em 1946, ambas no mes de maio. Este fato fez com que se divulgasse entre ele a noção do perigo que a aranha constitue e atualmente até as crianças a conhecem e perseguem

---

* As aranhas coletadas por MACHADO foram classificadas por MELLO LEITÃO na espécie L. curacaviensis. Preferiu MACHADO admitir que pertenciam a espécie L. mactans, uma vez que considerou como VELLARD aquela espécie uma variação regional desta.

destruindo os exemplares que encontram". (MACHADO, 1948).

Com as aranhas capturadas, realizou MACHADO experiências de picada direta em cobaias e camundongos, assinalando espasmos dos músculos respiratórios e morte dentro de curto espaço de tempo (cobaia, 2 horas, camundongos, 20-30 minutos).

BÜCHERL (1971) relata que "Em julho de 1961 foi a opinião pública da cidade do Rio de Janeiro, de Niterói e de algumas cidades da Baixada Fluminense sacudida pelo súbito e inexplicável aparecimento da grande quantidade de "viúvas-negras", primeiro na praia do Fundão, depois em volta da Base Aérea do Galeão, finalmente na vegetação das praias de Piratininga, Itaipu e em outros locais". Refere a ocorrência de acidente em um industrial que teve de ser hospitalizado. Em excursão pelas praias de Piratininga, Itaipu, Itacaotiara e Itaipuaçu, BÜCHERL e seus colaboradores capturaram perto de 2.000 viúvas-negras vivas. Como MACHADO, verificou a nítida preferência dessas aranhas pela Ipomoea pescaprae.

Família Scytodidae, Gen. Loxoceles. Estas aranhas se acham largamente distribuídas em regiões temperadas e tropicais. Espécies nativas são somente conhecidas em duas regiões, África e Américas. Sedentárias, vivendo sobre ou dentro da teia, apresentam hábitos estritamente noturnos. Quando afugentadas e fora da teia, são bastante ágeis. Cefalotórax e pernas amarelo marrons, abdome com aspecto de pequena azeitona de cor cinza esverdeada. Suas dimensões oscilam entre 8 e 15mm apenas, e suas delicadas pernas acham-se cobertas apenas de imperceptível penugem. Trata-se, pois, da menor entre as aranhas perigosas ao homem. Seus ferrões fortemente recurvados não ultrapassam 0,3 milímetros, de maneira que é quase inacreditável que possa picar através da pele humana. (BÜCHERL, 1980).

"Na natureza são encontradas sempre em ambientes escuros, em buracos e fendas de barrancos, em vãos e fendas sob troncos, em cavernas e grutas, com predileção sob taquarais, onde nidificam sob a folhagem seca em volta dos tocos de bambu. Desses esconderijos acercam-se facilmente das residên

cias humanas no campo, em fazendas, sítios, nos quintais de bairros e arrabaldes das cidades, seja por locomoção ativa durante a noite ou por serem introduzidas em meio a madeiras, tijolos, telhas." (BÜCHERL, 1980). Tanto o macho quanto a fêmea tece suas teias irregulares nos cantos mais escuros. Alimentam-se de môscas, mariposas e outros pequenos artrópodos que se enroscam nas teias. Além disso também buscam alimentos à noite. A extensão da teia não excede geralmente de 5 a 8 centímetros e sua altura apenas 1 centímetro. Quando suas teias são destruídas, fogem atemorizadas empreendendo rápida fuga, sempre em direção a um lugar bem escuro. Não picam, são pacíficas, não parecem prejudicar a ninguém, podem viver em grande número junto ao homem sem que se registre um só acidente. "A fase de vida errante, isto é, quando por um motivo qualquer foram afugentadas de suas teias, parece-nos justamente a mais propícia para ocasionar contatos diretos entre essas aranhas e o corpo humano. Não picam quando correm pelo corpo, pelas mãos, braço ou rosto. Mas no momento de serem aprisionadas e espremidas contra o corpo, por exemplo, ao ser vestida a roupa, costumam picar e inocular sua pequena dose de veneno". (BÜCHERL, 1980). As espécies mais importantes e que causam acidentes no homem são: Loxoceles laeta, provavelmente originária da América do Sul, encontrada no Chile (Araña de los Rincones), Argentina, Uruguay, Brasil, Equador e Peru; Loxoceles reclusa, nativa nos Estados Unidos, mais frequente no sul e estados centrais; Loxoceles rufescens provavelmente originária do Mediterrâneo, regiões da Europa e África; L. gaucho encontrada principalmente no Brasil.

O loxocelismo se apresenta sob duas formas: forma cutânea e forma víscero-cutânea. A forma cutânea de loxocelismo é a mais comumente observada e pode consistir tanto de edema e necrose locais da pele como somente de edema. Ambas as lesões são muito dolorosas. A necrose local usualmente começa em área de edema o qual apresenta centralmente placa violácea circundada por halo eritematoso. Esta placa pode progredir para uma cor escura e, formações pustulosas podem aparecer em sua superfície (40-41% dos casos). Usualmente esta lesão não é

acompanhada de aumento dos gânglios linfáticos locais e,quando isto acontecer, é devido a infecções bacterianas secundárias. A escara, de acordo com seu tamanho e profundidade pode desaparecer entre 2a. e 5a. semana. A úlcera não compromete a camada muscular. A forma edematosa sem necrose a qual ocorre em 4,5% dos casos, consiste de grande edema, particularmente quando a picada for na face. Secundariamente, 75% dos pacientes apresentam um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: insonia, sensação febril, astenia, náusea e vômito.

A forma vîscero-cutânea é muito severa. No Chile ocorre, em média, em 13% do número total de casos de loxocelismo. Além das manifestações locais, idênticas às observadas na forma cutânea, a maioria dos sintomas consiste de anemia hemolítica, hemoglobinúria, hematúria, icterícia, febre e envolvimento sensorial que aparece geralmente entre as primeiras 6-24 horas. A temperatura pode chegar a 41ºC. A urina apresenta cor escura semelhante à da coca-cola. A ocorrência desta síndrome não tem relação com idade, sexo, local da picada e tão pouco com o tamanho da lesão local (SCHENONE e SUAREZ, 1978).

O fracionamento do veneno de Loxoceles reclusa revelou duas frações proteicas, denominadas toxina 1 e toxina 2. A toxina 1 não só produz lesões locais em coelhos, como também é letal para este animal e camundongos. A toxina 2 não produz lesões locais, mas é tóxica para coelhos. (BETTINI e MAROLI, 1978).

Família Lycosidae. Esta família possui diversas sub-famílias, muitos gêneros e milhares de espécies. Mais de 300 foram descritas na América do Sul, cerca de 120 no Brasil. Encontram-se em todas as regiões tropicais, sub-tropicais e em zonas temperadas, mesmo onde neva. Sua identificação é relativamente fácil. "As fêmeas são mais encorpadas que os machos; seu corpo atinge em média pouco mais de 3 centímetros e suas pernas cerca de 4 centímetros. No meio do cefalotórax corre faixa clara, longitudinal, da qual costumam irradiar estrias para os lados, mais visíveis nos machos. Sobre seu abdome há faixa longitudinal também clara em fundo cinza ou marrom,

faixa essa que se bifurca para trás. As pernas tem pelos claros e manchas cinzentas nas dobraduras das articulações. Em torno de sua quelíceras há pelos curtos cor de fogo". (BÜCHERL, 1980).

As Lycosas são aranhas astutas, caçadoras ágeis; apreendem sua presa no pulo e matam-na com sua peçonha. São encontradas com grande facilidade nos campos, à beira de piscinas, nos gramados dos jardins; gostam de expor-se ao sol da tarde, apreciam a secura do seu habitat mas dentro de uma atmosfera relativamente úmida-

As fêmeas depois do acasalamento, cavoucam um tubo no solo de até 30 ou mesmo 40 centímetros de profundidade; no fundo do tubo constroem um alargamento que lhes serve de moradia. Chovendo muito, fabricam rapidamente um opérculo protetor que costumam retirar tão logo surja "tempo bom". (BÜCHERL, 1980).

Na América do Sul, as espécies que mais acidentes causam no homem são: Lycosa erythrognata e L. raptória. VITAL BRAZIL e VELLARD (1925) descreveram a sintomatologia e evolução de envenenamento provocado por Lycosa da seguinte maneira: "o doente sente, no momento da picada, uma dor assaz viva, mas passageira; pouco a pouco o membro ferido começa a tumefazer-se, ao mesmo tempo que a dor volta lancinante; no dia seguinte nota-se um edema considerável, com suffusão sanguinea, em cujo centro se distingue o logar da picada, pela presença de uma pequena eschara; não há, em via de regra, hyperthermia; por vezes observa-se urticaria generalizada, mas sem reaações ganglionaes; o estado geral é, em via de regra, bom; nos dias seguintes o edema se estende ainda mais, podendo occupar todo o membro, acompanhado algumas vezes de phlyctenas; pouco a pouco a eschara augmenta, um sulco de eliminação se forma e uma placa de tecido necrosado, muitas vezes consideravel, se elimina; a cura é lenta, a cicatriz indelevel e frequentemente retratil e dolorosa. Nos casos mais benignos, atribuiveis talvez a outras especies, nota-se uma tumefação passageira, que pode ser acompanhada de urticaria". VITAL BRAZIL e VELLARD (1925) realizaram experiências em cobaias e coelhos. Verificaram que a peçonha da Lycosa somente produz necrose quando injetado por

via intradérmica. Obtiveram o soro antilicósico pela imunização de carneiros. Para a sua dosagem utilizaram coelhos. O ponto de inoculação foi o pavilhão da orelha, devido à maior facilidade das injeções, assim como a leitura dos resultados.

O sôro foi ensaiado pela primeira vez no homem por VITAL BRAZIL e VELLARD (1925): O paciente, homem forte, de 40 anos de idade, negociante ambulante de leite, foi picado no pescoço. Duas horas após o acidente, foi ao Butantan à procura de socorro médico. Acusava dor intensa na região ofendida, dor que se irradiva para a cabeça e espáduas. O exame mostrou forte eritema acompanhado de edema muito pronunciado na região da picada. Foi injetado neste paciente 10 cc de soro, subcutaneamente, no braço esquerdo. No dia seguinte, logo pela manhã ao visitar o indivíduo picado, em sua residência, não o encontrou, pois dormira bem a noite e sentindo-se bem, saíra para suas ocupações diárias. Mais tarde sendo examinado, foi observado que os fenômenos locais haviam regredido completamente, permanecendo somente uma ligeira vermelhidão no lugar da picada .

Família Ctenidae. São aranhas popularmente conhecidas por "armadeiras", pois, quando ameaçadas costumam "armar-se para o bote", isto é, colocam-se rapidamente em pe, encolhem os dois últimos pares de pernas como dois feixesde molas enrolados, elevam seu corpo em posição quase vertical, erguem as patas dianteiras e distendem suas presas de veneno.Nessa "defesa armada" observam atentamente todos os movimentos de seu inimigo, acompanhando-os com o balançar de seu corpo. (BÜCHERL, 1980). A distância de seus saltos chega a 30 centímetros. As aranhas armadeiras vivem solitárias, são irascíveis e ferozes, não tolerando a presença nem de companheiros da mesma espécie. Atinge cerca de 3 a 5 centímetros de corpo e 9 a 10 no comprimento de suas pernas. O macho é pouco menor que a fêmea. Tanto o macho como a fêmea são de cor castanho acinzentado. Possuem 8 olhos em 3 filas (dois na primeira, quatro na segunda e novamente dois grandes olhos na terceira fila), dispostos em dois planos sobre a curvatura da fronte na porção

anterior do cefalotórax.

Desta família o gênero Phoneutria é o mais importante: Ph. nigriventer outrora denominado Ctenus nigriventer e Ph. keyserling outrora Ctenus ferus. A espécie nigriventer no Brasil se distribui mais no interior do país, enquanto a espécie keyserling mais na região do litoral. (EICKSTED, 1978/1979).

As aranhas armadeiras são exclusivamente sul americanas, devendo ocorrer, com maior ou menor frequência, em quase todos os países deste sub-continente. Elas nunca constroem teias, são crepusculares e noturnas, isto é, não ousam enfrentar por longo tempo a luz diurna direta. Seu habitat é portanto local escuro, buraco no solo ou sob vegetação, entre folhagem, sob troncos de árvores na face interna, ou dentro das bainhas das bananeiras, inclusive por entre os cachos de bananas. ("banana-spider" dos norte americanos). Sua alimentação consiste principalmente em grilos, gafanhotos, vagalumes, besouros, outras aranhas menores, baratas, etc.. São relativamente raras, mas apesar disso, são frequentes os acidentes. No Hospital "Vital Brazil" Instituto Butantan, cerca de seiscentas pessoas picadas pela aranha em questão são anualmente atendidas (Oswaldo Vital Brazil - comunicação pessoal). Os clientes provêm da cidade de São Paulo e arredores e devem consistir em apenas parcela pequena das picadas em todo o Estado e no Brasil, principalmente na região centro sul. Há referências seguras sobre mortes de crianças em 6 a 12 horas após o acidente. "Alguns anos atrás um policial nos trouxe de São Sebastião, no litoral norte do Estado de São Paulo, uma Phoneutria em vidro com álcool e um ofício da delegacia daquela cidade. Este dizia que distante alguns quilômetros daquela cidade acontecera uma verdadeira tragédia em casa de um caiçara: dois irmãozinhos, um com 6 e o segundo com 18 meses de idade, que dormiam na mesma cama, despertaram seu pai com gritos e choramingos. O pai procurava, segundo ele declarara perante a autoridade, acalmá-los, dando-lhes leite em mamadeira, o que foi recusado. Daí a pouco as crianças morreram. Retirando os lençóis, encontrou o pai a aranha, a que acompanhava o ofício. Respondi ao delegado que

se tratava de uma Phoneutria nigriventer. (BÜCHERL, 1980).

VITAL BRAZIL e VELLARD (1926) referem como sinais e sintomas mais frequentes nos acidentes por Phoneutria: dor intolerável com paroxismos, caimbras, tremores suores profusos, hipotermia, taquicardia e arritmias.

A seguir transcrevemos uma de suas observações:

"Accidente muito grave por Ctenus nigriventer.

Senhora F. N., com 22 annos, gravida de 4 mezes, picada a 14 de Abril de 1926 as 9 horas da manhãn na mão esquerda por um Ctenus nigriventer escondido em seus sapatos. Dores intoleráveis, generalisadas, com paroxysmos.

Às 10 horas veio ao Butantan, extremamente abattida, não podendo suster, respondendo com dificuldade as questões, gemendo sem cessar; caimbras e tremores generalisados; abundantes suores frios; temperatura 36ºC, pulso filiforme, desigual, entre 100 e 150. Recebeu 5 c.c. de sôro anti-cteno. Às 10 horas e 30 minutos a prostação accentuou-se, o pulso cada vez mais fraco e incontavel. Perto das 11 horas começa a melhorar; o abatimento começa de ceder, a paciente responde mais facilmente as perguntas que lhe faz, temperatura 36ºC, pulso 120. A dor não é tão forte, intermittente, os tremores e as caimbras são localisadas ao braço doente; às 14 horas e 30 minutos a paciente é levada para sua casa, a noite passa bem e na manhãn seguinte persistesômente um ligeiro formigamento da mão".

IV - MATERIAL E MÉTODOS

O estudo das ações da peçonha de Phoneutria nigriventer na junção neuromuscular e músculo esquelético foi efetuado nas preparações nervo frênico-diafragma e hemidiafragma cronicamente desnervado de rato. Na primeira verificou-se o efeito da peçonha na tensão das respostas do diafragma, curarizado ou não, à estimulação elétrica do nervo ou do músculo, na liberação espontânea ou evocada da acetilcolina e nos potenciais bioelétricos do músculo (potencial de repouso, potencial de placa terminal em miniatura, potencial de placa terminal e potencial de ação). Na preparação hemidiafragma cronicamente desnervado estudou-se o efeito de peçonha na tensão das respostas do músculo à excitação elétrica, à acetilcolina e ao potássio.

A determinação da significância da diferença entre as médias foi realizada com o uso do teste t de STUDENT a nível de (5%).

IV.1. - Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Rato

Foram utilizados ratos brancos de 180 a 200 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 uma porção do nervo frênico correspondente, de acordo com a técnica descrita por BÜLBRING (1946). O músculo de forma triangular foi fixado por sua base em suporte apropriado (o qual permitia através de eletrodos de platina estimular o nervo ou diretamente o músculo) e o vértice correspondente à sua porção tendinosa foi unido por um fio a um miógrafo isométrico E&M, modêlo "linear core" F.50, acoplado ao fisiógrafo E&M, modêlo P.M.P. - 4A, para registro das tensões das respostas ao músculo. O volume do banho foi de 50 ml e sua temperatura mantida a 37ºC. Oxigenou-se a preparação

pelo borbulhamento de carbogênio (95% O_2 e 5% CO_2) no banho. Como meio nutritivo usou-se a solução de TYRODE com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; $CaCl_2$ 1,8; $NaHCO_3$ 11,9; $MgCl_2$ 0,25; NaH_2PO_4 0,3 e glicose 11,0. Em algumas experiências reduziu-se na solução nutritiva o teor de cloreto de sódio para 5mM, substituindo-se por sucrose em correspondência isosmolar.

Na estimulação indireta do diafragma utilizaram-se pulsos retangulares maximais, frequências de 0,1 Hz e duração de 0,2 mseg. Na direta usou-se voltagem de até 100 V, freqência 0,1 Hz e duração de 2 mseg. Os estímulos foram fornecidos por um estimulador GRASS modêlo S4.

Em todas as experiências estimulou-se o nervo frênico por um período de 30 minutos (controle), tempo suficiente para ocorrer o equilíbrio da preparação. A seguir foi adicionada a peçonha ao banho (1, 5 ou 25 ug/ml). No registro das contrações foram utilizadas 2 velocidades do fisiógrafo; 0,02 cm/seg e a cada 15 minutos 1 ou 2 registros com velocidade de 5 cm/seg.

Estudou-se o efeito do cálcio ($CaCl_2$-10 mM), do metilsulfato de neostigmine (Neo $5,98.10^{-3}$ mM) e da 4-amino piridina (4AP - 0,37 mM) no bloqueio causado pela peçonha nas concentrações de 5 e 25 ug/ml. Pesquisou-se também o efeito antagonistico da peçonha (1, 5 ou 25 ug/ml) sobre o bloqueio neuromuscular produzido pela dtubocurarina (dTc - $1,46.10^{-3}$ mM).

Estudou-se também o efeito da peçonha em preparações curarizadas (dTc - $14,6.10^{-3}$ mM) estimuladas diretamente. Com preparações curarizadas ou não observou-se o efeito da peçonha, na ausência de estimulação elétrica.

IV.1.1. - Liberação de Acetilcolina

A pesquisa do efeito produzido pela peçonha de Phoneutria nigriventer sobre a liberação de acetilcolina foi realizada na preparação nervo frênico-diafragma de rato, usando-se uma cuba especial de 5 ml de capacidade. Todas as outras

condições foram idênticas às já descritas. Contudo, usou-se a solução de Tyrode com metilsulfato de neostigmine ($1,49.10^{-3}$ mM).

As seguintes etapas foram realizadas após o diafragma estar suspenso na cuba. 1) O músculo foi deixado em repouso por 40 minutos ao término do qual trocou-se a solução nutritiva. 2) Deixou-se a preparação em repouso por um período adicional de 20 minutos, ao fim do qual coletou-se o líquido do banho para ensaio biológico da acetilcolina (primeira liberação espontânea) e uma nova solução de TYRODE foi adicionada à cuba. 3) Estimulou-se o nervo frênico por um período de 23 minutos, sendo 3 minutos com frequência de 0,1 Hz e 20 minutos com 25 Hz; novamente coletou-se o líquido do banho para ensaio de acetilcolina (primeira liberação por estimulação elétrica) e a preparação lavada. A seguir foi adicionado a peçonha e após 40 minutos procedeu-se à lavagem da preparação (somente uma vez). 4) Deixou-se o músculo em repouso por 20 minutos e o líquido foi coletado para ensaio (primeira liberação espontânea em presença da peçonha); nova solução de TYRODE foi adicionada. 5) Estimulou-se o nervo frênico como em (3) e o líquido coletado para novo ensaio (primeira liberação por estimulação elétrica em presença da peçonha); trocou-se outra vez a solução nutritiva. A preparação foi deixada em repouso por mais 40 minutos, após o qual lavou-se a preparação (uma vez). 6) Deixou-se o músculo em repouso por 20 minutos e o líquido coletado para ensaio (segunda liberação espontânea em presença da peçonha). 7) Estimulou-se o nervo frênico como em (3) e (5) e o líquido foi coletado para a última dosagem da acetilcolina (VITAL BRAZIL et al, 1969). Na pesquisa sobre a liberação da acetilcolina utilizou-se a peçonha nas concentrações de 1, 5 e 25 ug/ml.

Todas as amostras coletadas foram acidificadas a pH ≅ 5.0. As dosagens da acetilcolina liberadas foram efetuadas na preparação íleo de cobaia segundo o método de PATON e VIZI (1969) modificado.

Os registros das contrações do íleo foram feitos no papel esfumaçado em quimógrafo através de uma pena inscritora frontal com amplitude 1:9 e equilibrada com 0,5g.

Na avaliação da acetilcolina liberda foi usado o teste de 3 pontos. A solução padrão de acetilcolina foi sempre preparada no dia da experiência.

A solução nutritiva utilizada foi a de KREBBS (composição em mM: NaCl 136,8; KCl 2,7; $CACl_2$ 1,8; $NaHCO_3$ 12,0; $MgCl_2$ 0,5; NaH_2PO_4 0,3 e glicose 11,0) com sulfato de morfina ($14,9.10^{-3}$ mM), metilsulfato de neostigmine ($1,49.10^{-3}$ mM) e cloridrato de difenidramina ($1,829.10^{-3}$ mM). Borbulhamento de carbogênio (95% O_2 e 5% de CO_2), temperatura de 37ºC e volume da cuba igual a 4 ml.

IV.1.2. - Estudo do Potencial de Repouso, Placa Terminal em Miniatura, Potencial de Placa Terminal e Potencial de Ação

Utilizaram-se ratos brancos de 180 a 200 g de peso, cujo hemidiafragma esquerdo foi retirado com um segmento do nervo frênico correspondente, segundo técnica já descrita. Estendeu-se o músculo e fixou-se com alfinetes apropriados 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. A cuba foi preenchida com 50 ml de solução de TYRODE, sendo a oxigenação da preparação feita pelo borbulhamento de carbogênio. Manteve-se o banho à temperatura de 37ºC. Os potenciais foram captados através de microeletrodos (Me) de vidro preenchidos com solução de KCl 3M. Os Me apresentaram resistência compreendida entre 5 - 25 MΩ. Foram preparados no próprio laboratório e conservados em geladeira. Para sua confecção utilizaram-se tubos de vidro apropriado e um "Microelectrode Puller" CPF, modêlo 8104, PALMER.

Descrição Sumária do Circuito

O Me entrava em contato por sua extremidade posterior com filamento em espiral de prata cloretada, contido no interior de pequeno tubo de vidro (2 cm de comprimento)

preenchido com ágar. Encaixava-se o Me 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 a um microscópio estereoscópico ZEISS para aumento de até 40 vezes. Este equipamento permitia realizar pequenos deslocamentos verticais e horizontais, controlando o Me. O seguidor catódico estava posicionado próximo ao braço do micromanipulador e conectava-se ao canal do osciloscópio TEKTRONIX 5.103 N com módulos 5A 22N "Differential Ampl" e 5812 N "Dual time Base". O eletrodo indiferente, constituído por um fio espiralado de prata cloretada contido em tubo de vidro curvo preenchido com ágar, mantinha-se mergulhado na solução nutritiva. 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 e toda a aparelhagem empregada permaneciam no interior de uma gaiola de FARADAY montada sobre uma mesa rígida, fixada no solo afim de evitar vibrações. O circuito descrito está esquematizado de forma simplificada na figura 1.

Procedimento

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 ao seguidor catódico. Procedia-se à medida da resistência do Me mergulhando-o na solução nutritiva e introduzindo em paralelo no circuito uma resistência de valor conhecido (20 MΩ) figura 1. Eram desprezados aqueles cujas resistências não estavam compreendidas entre 5 e 25 MΩ. A determinação do potencial de repouso (P.R.) das fibras musculares fez-se da seguinte maneira: sob controle microscópio inseria-se o microeletrodo no interior de uma fibra muscular e media-se o deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da penetração. Repetia-se o mesmo procedimento em 5 fibras distintas em períodos não supe-

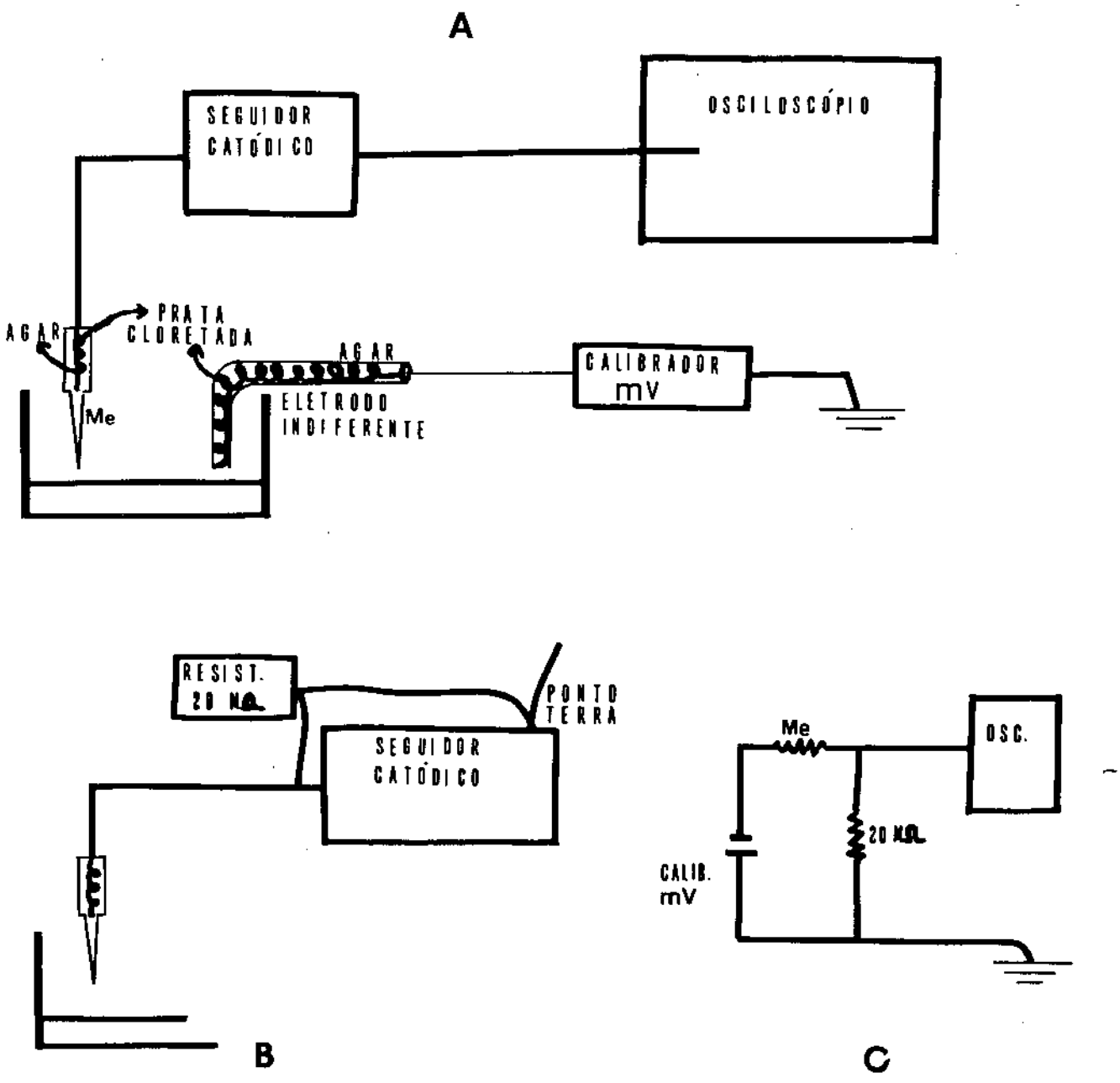


Fig. 1: Esquema do circuito para registro eletrofisiológico dos potenciais de repouso, de placa terminal em miniatura, de placa terminal e do potencial de ação.

A - circuito simplificado

B - circuito simplificado para a obtenção da resistência do Me

C - circuito para medida da resistência do Me

riores a 1 minuto, calculando-se a média aritmética das leituras realizadas. Determinava-se o P.R. multiplicando-se o valor da média por um fator de correção (fc). Este era estabelecido introduzindo-se no circuito um sinal de 100 mV e medindo-se a deflexão correspondente no osciloscópio (fc = 100/deflexão correspondente).

IV.1.2.1. - Potencial de Repouso (P.R.)

Nas experiências realizadas para avaliar o efeito da peçonha sobre o potencial de repouso, utilizou-se a peçonha nas concentrações de 1, 5 ou 25 ug/ml. A determinação do P.R. foi feito em regiões distintas no músculo (regiões das terminações nervosas e regiões distantes das mesmas). Após a determinação controle do P.R. juntava-se a peçonha nas concentrações mencionadas e procedia-se à leitura do P.R. aos 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos. Em algumas experiências, decorrido aos 120 minutos, adicionou-se o Ca (10 mM) e as leituras foram realizadas após 20 minutos da adição, na região das terminações nervosas. Estudou-se também o efeito da adição prévia de dTc ($14,6.10^{-3}$ mM) sobre as eventuais alterações do P.R. determinada pela peçonha (concentrações já mencionadas). Adicionava-se a dTc e decorridos 30 minutos faziam-se as leituras do P.R.. A seguir juntava-se a peçonha e as leituras do P.R. eram realizadas aos 15, 30 e 60 minutos. Nessas experiências ainda foi adicionado a tetrodotoxina (TTX - $3,13.10^{-3}$ mM) e decorridos 30 minutos procedia-se à leitura do P.R.. Utilizando-se ainda a preparação previamente curarizada, verificou-se o efeito da peçonha (concentração 25 ug/ml) sobre o P.R. em presença de solução de TYRODE com baixo teor em Na^{+} (NaCl 5 mM).

Em algumas experiências adicionou-se previamente a α-bungarotoxina ($2,5.10^{-3}$ mM) e somente 60 minutos após, quando se verificou o bloqueio neuromuscular completo da preparação, pela não resposta à estimulação elétrica indireta, é que foi adicionada a peçonha nas concentrações de 1 ou 5 ug/ml.

IV.1.2.2. - Potencial de Placa Terminal em Miniatura (p.p.t.m.)

Nas experiências em que se estudou o efeito da peçonha sobre a amplitude e frequência dos p.p.t.m., utilizou-se a peçonha nas concentrações de 1, 5 ou 25 ug/ml e a TTX na concentração de $3,13.10^{-3}$ mM em algumas experiências.

Os p.p.t.m. foram registrados através do osciloscópio (sensibilidade 0,5-1,0 mV/cm) e captados através da inserção do microletrodo nas fibras musculares ao nível das terminações nervosas. Os mesmos foram fotografados com filme "polaroid" por meio de "camera osciloscope" modelo C-5A. Os parâmetros controles foram definidos antes da adição da peçonha.

IV.1.2.3. - POTENCIAL DE PLACA TERMINAL (p.p.t.)

Nas experiências que se estudou o efeito da peçonha sobre os potenciais de placa terminal, a concentração utilizada foi de 5 ug/ml. Para a captação dos p.p.t., curarizou-se a preparação (dTc $0,73.10^{-3}$ mM) e após ter ocorrido o bloqueio neuromuscular, o Me foi inserido nas fibras musculares (região das terminações nervosas). Através de estimulador GRASS, modêlo S4 e de unidade isoladora de estímulos GRASS modêlo S.I.U.5 estimulou-se indiretamente a preparação com pulsos de 0,5-1,0 volts, 0,2 mseg. de duração e 0,1 Hz de frequência. Os p.p.t. foram registrados através do osciloscópio (sensibilidade 0,5-2,0 mV/cm). Foram fotografados de maneira idêntica aos dos potenciais de placa terminal em miniatura.

IV.1.2.4. - Potencial de Ação

Nas experiências realizadas para avaliar-se as possíveis ações da peçonha sobre o potencial de ação, utilizou-se as concentrações de 1, 5 ou 25 ug/ml da peçonha. Através do estimulador e unidade isoladora de estímulos (já mencio

nados) estimulou-se indiretamente a preparação com pulsos de 0,3 V; 0,2 mseg de duração e frequência de 0,1 Hz. O registro dos potenciais de ação foi efetuado de modo idêntico ao utilizada nos p.p.t., variando somente a sensibilidade do osciloscópio para 20 mV/cm. Os potenciais de ação também foram fotografados.

IV - 2. Preparação - Hemidiafragma cronicamente desnervado do rato.

A desnervação foi levada a efeito segundo técnica descrita por VITAL BRAZIL (1965). O peso dos animais, a solução nutritiva, volume do banho, a oxigenação, a temperatura do banho, assim como o registro das contrações foram iguais aos já descritos.

Realizaram-se experiências com a finalidade de avaliar os efeitos da peçonha sobre as respostas à estímulos elétricos. Para isso após a verificação da desnervação (resposta à adição da acetilcolina $14,6.10^{-3}$ mM ao banho) e decorrido o tempo de equilíbrio, adicionou-se a peçonha nas concentrações de 5 ou 25 ug/ml. No registro das contrações do músculo foram utilizadas 2 velocidades do fisiográfo; 0,02 cm/seg e a cada 15 minutos 1 Ou 2 registros com velocidade de 5 cm/seg.

Nessa preparação pesquisou-se também o efeito da peçonha sobre a contratura provocada pela acetilcolina. A peçonha de Phoneutria nigriventer foi adicionada à cuba, somente quando se verificou a regularidade das respostas tanto para os estímulos elétricos, como para a acetilcolina. O neurotransmissor permanecia em contato com a preparação por 30 segundos, sendo a seguir processada a lavagem da mesma por 15 minutos, a cada 3 minutos. De maneira idêntica, pesquisou-se o efeito da peçonha sobre a contratura provocada pelo potássio (KCL 26.10^{-3} mM).

No diafragma cronicamente desnervado, verificaram-se as ações da peçonha na solução de TYRODE com alto teor em cálcio ($CaCl_2$ 10mM). Fez-se ainda, nessa preparação algumas experiências para avaliação dos efeitos da peçonha (25 ug/ml) sobre o P.R.

V - PEÇONHA DE *Phoneutria nigriventer*

A peçonha utilizada na presente pesquisa foi obtida por estimulação elétrica, nos laboratórios da Secção de Artrópodos Peçonhentos do Instituto Butantan.

Realizaram-se as determinações da DL_{50} da peçonha em camumdongos brancos de 17 a 21 g de peso, usando-se a via venosa. As 4 doses da peçonha contidas em 0,5 ml estavam entre si em progressão geométrica de razão igual a 1,5. Foram usados 6 animais por dose. Observaram-se os efeitos desde o momento das injeções até 24 horas após, quando se anotaram as mortes e sobrevidas.

Calcularam-se as doses letais medianas e respectivos intervalos fiduciais a nível de 95% pelo processo de WEIL (1952). Usaram-se também os métodos de REED-MUENCH, "PROBIT", Binômio, Logit e Log-log (Tabela I).

TABELA I - VALORES DA DOSE LETAL MÉDIA EM CAMUNDONGOS POR VIA VENOSA

(Venosa de Phoneutria Nigriventer)

Métodos	Limite Inferior (ug/kg)	Dose Letal Média (ug/kg)	Limite Superior (ug/kg)	Intervalo de Confiança (S)	(Qui Quadrado)
Reed-Muench	326,18	379,58	441,76	0,34669	----
Thompson-Weil	335,22	377,03	424,05	sf=0,26874	----
Binômio (3 doses)	318,08	376,63	445,11	0,39669	Ajusta mas as frequências são baixas
Binômio (4 doses)	313,48	372,87	443,51	0,2756131	Ajusta mas as frequências são baixas
Probit	332,01	374,63	422,62	----	0,0355 N.S. 2 GL
Logit	332,08	373,89	420,96	0,2711131	0,0736 N.S. 2 GL
Log-log	329,17	379,45	437,42	0,325044	0,00223 N.S. 2 GL

VI - DROGAS UTILIZADAS

As drogas utilizadas na presente pesquisa foram as seguintes:

- Ágar - Difco Laboratories, EUA
- Hidrato de cloral - Pentoforma Ltda.,S.P
- d-tubocurarina - Abbott Laboratórios do Brasil, Ltda., S.P.
- tetrodotoxina - Sigma Chemical Company , EUA. .
- α-bungarotoxina - Sigma Chemical Company, EUA.
- Fosfato dibásico de sódio, PA -Carlo Erba. Itália.
- Cloreto de magnésio - Merck do Brasil
- Bicarbonato de sódio, PA - Carlo Erba, Itália.
- Glicose - Merck do Brasil
- Iodeto de acetilcolina - Sigma Chemical Company, EUA.
- Metilsulfato de neostigmine - Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos, S.A.
- Ácido clorídrico - Kikion Indústrias Químicas, S.P.
- Sulfato de morfina - Laboratórios Emila,
- Difenidramina - Laboratórios Parke Davis Ltda.
- Cloreto de sodio - Merck do Brasil
- Cloreto de cálcio - Merck do Brasil
- Cloreto de potassio - Merck do Brasil
- 4 aminopyridina - Aldrich Chemical Company, Inc, USA.

VII - RESULTADOS

VII - 1. PREPARAÇÃO NERVO-FRÊNICO DIAFRAGMA DE RATO

Em preparações não estimuladas, a adição da peçonha (5 ug/ml) de Phoneutria nigriventer (P.nig.) ao banho provocou o aparecimento de contração tônica espontanea a qual se superpuseram numerosas contrações fásicas de amplitude variável (Fig.2). Estes efeitos foram abolidos pela curarização (dTc 14,6 x 10^{-3} mM) da preparação (Fig. 2).

Em diafragmas estimulados indiretamente (pulsos maximais; 0,2 mseg. de duração: 0,1 Hz de frequência) a peçonha nas tres concentrações (1, 5 ou 25 ug/ml) causou contração tônica espontânea inicial, aumento da tensão das respostas à estimulação do nervo, retardo em seu relaxamento e contrações fásicas espontâneas de pequena amplitude (Fig. 3 e 4). Estas foram numerosas e constantes quando o veneno encontrava-se na concentração de 5 ug/ml (Fig. 4). A tensão da contração tônica espontânea inicial dependeu da concentração da peçonha no banho (Tab. II, Figs. 3 e 4), pois, a diferença entre as médias do efeito nas várias concentrações do veneno mostrou ser significativa. Em relação aos outros (aumento máximo da tensão das respostas à estimulação do nervo e retardo em seu relaxamento), a diferença entre as médias nas tres concentrações da peçonha foi não significativa, ou seja, os efeitos não foram dose-dependentes (Tabs. III e IV). O aumento máximo da tensão das respostas à estimulação do nervo variou quanto ao intervalo de tempo entre a adição da peçonha e seu aparecimento (Tab. III). Na concentração de 1 ug/ml ocorreu em 30 min., na de 5 ug/ml em 10 min. e nas 25 ug/ml em 3 min.. Além dos efeitos acima referidos, a peçonha de P. nig. produziu bloqueio irreversível das respostas à estimulação indireta quando empregada nas concentrações de 5 e 25 ug/ml. Na de 1 ug/ml não as deprimiu. Bloqueio de 80% ocorreu em 108,33 $\pm$ 15 min. (n= 10) nas experiências com 5 ug/ml e em apenas 37,4 $\pm$ 8,5 min (n= 10) na

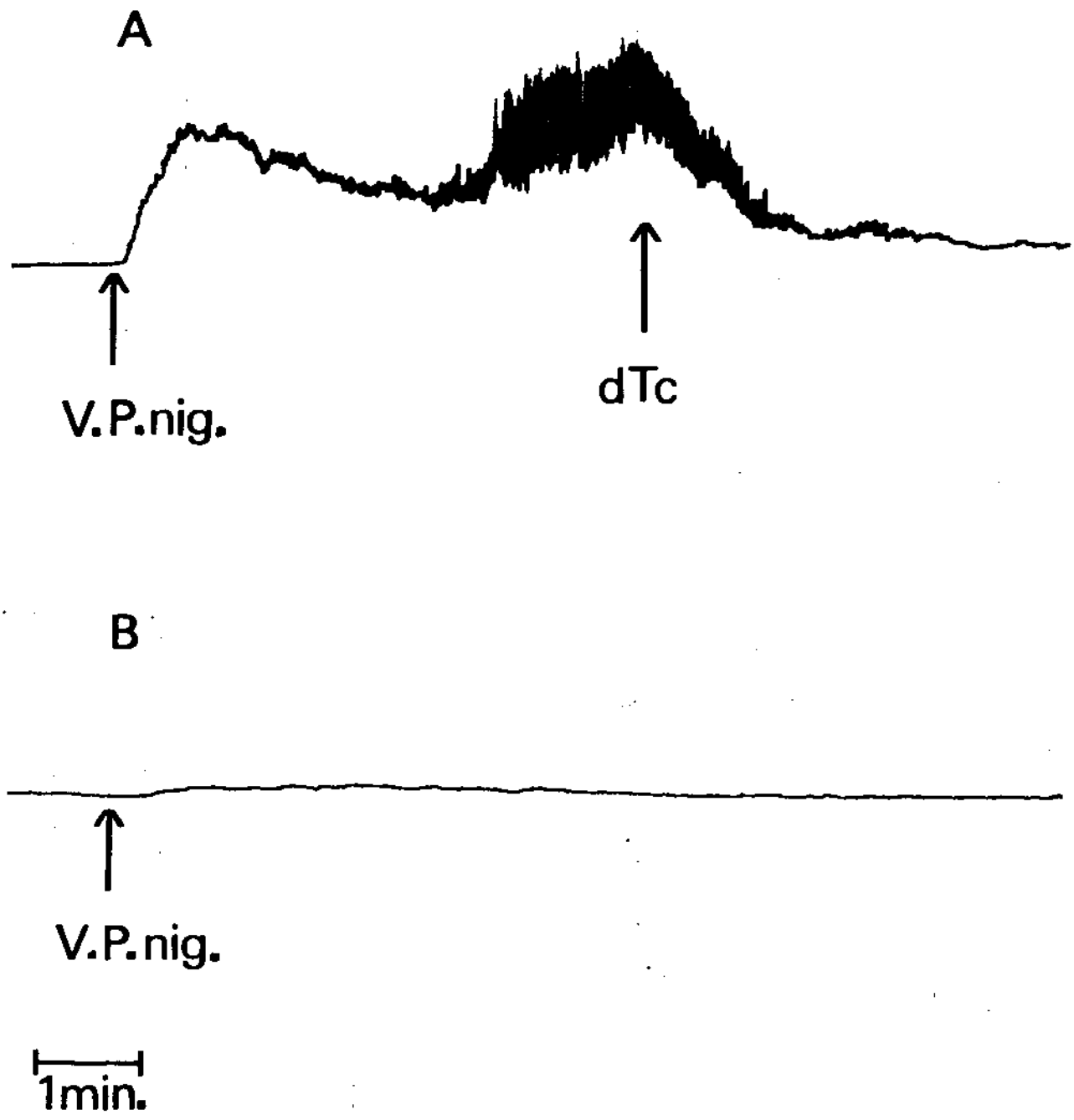


Fig. 2: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (5ug/ml) sobre a preparação nervo frênico diafragma de rato na ausência de estimulação elétrica.

Em A: adição da peçonha e de d-tubocurarina ($14,6 \times 10^{-3}$ mM).

Em B: adição da peçonha em preparação previamente bloqueada com d-tubocurarina ($14,6 \times 10^{-3}$ mM).

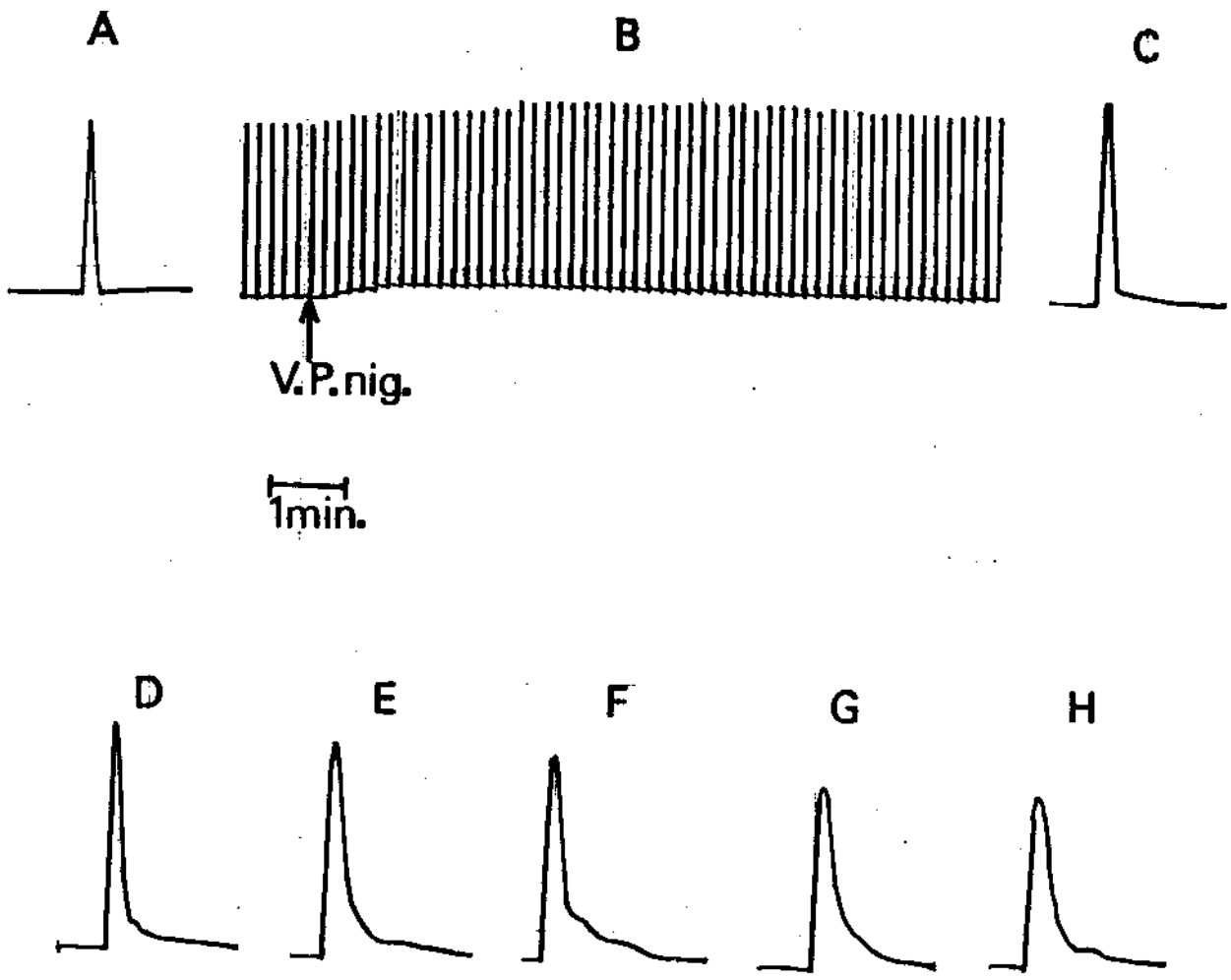


Fig. 3: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (1 ug/ml) sobre as respostas do diafragma provocadas pela estimulação eletrica indireta (pulsos maximais de 0,2 mseg e 0,1Hz).
A- controle; B- adição da peçonha; C- 10min; D- 20min.; E- 70min.; F- 100min.; G- 140min. e H- 170min. após adição da peçonha.
Em A, C, D, E, F, G e H velocidade no fisiografo de 5 cm/seg.
Em B velocidade de 0,02 cm/seg.

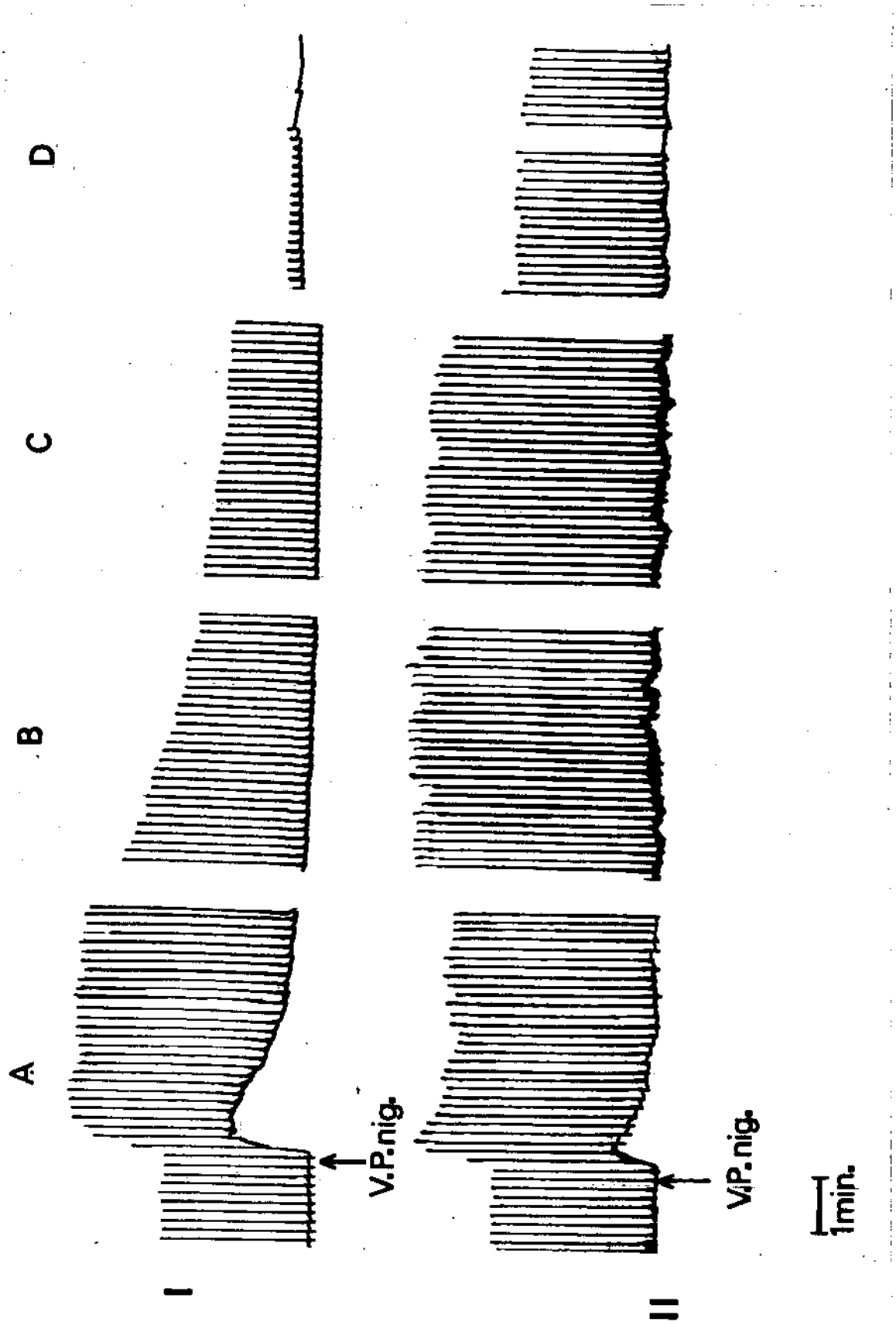

A
B
C
D
I
II
V.P.nig.
V.P.nig.
1min.

Fig. 4: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer sobre as respostas do diafragma à estimulação indireta (pulsos maximais de 0,2 mseg. e 0,1 Hz).
Em I A adição de 25 ug/ml da peçonha
Em II A adição de 5 ug/ml da peçonha
B- 10min.; C- 20min. e D- 40min. após adição da peçonha.

TABELA II - AMPLITUDE EM MILIMETROS DA CONTRAÇÃO TÔNICA ESPONTÂNEA APÓS ADIÇÃO DA PEÇONHA DE Phoneutria nigriventer AO BANHO; PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE RATO

		Preparação Nervo Frênico-Diafragma	
Experiências	Doses	Não Curarizada	Curarizada
1	1 ug/ml	3,0 mm	0,0 mm
2		3,0 mm	0,0 mm
3		4,0 mm	0,0 mm
4		3,0 mm	---
5		3,5 mm	---
Média ± E.P.		3,3 ± 0,2	
1	5 ug/ml	5,0 mm	0.0 mm
2		5,0 mm	0,0 mm
3		4,0 mm	0,0 mm
4		5,0 mm	2,0 mm
5		4,0 mm	0,0
6		7,0 mm	0,0 mm
7		9,0 mm	---
8		4,0 mm	---
9		4,0 mm	---
Média ± E.P.		5,22 ± 0,57	
1	25 ug/ml	15,0 mm	8,0 mm
2		11,0 mm	6,0 mm
3		15,0 mm	7,0 mm
4		12,0 mm	6,0 mm
5		9,0 mm	---
6		7,0 mm	---
7		13,0 mm	---
8		12,0 mm	---
9		13,0 mm	---
Média ± E.P.		11,88 ± 0,87	6,75 ± 0,47

E.P. - Erro padrão

TABELA III - AUMENTO DA TENSÃO DOS "TWITCHES" COM USO DE PEÇONHA DE Phoneutria nigriventer NA PREPARAÇÃO NERVOFRÊNICO-DIAFRAGMA DE RATO

Dose	Tempo de Observação	PREPARAÇÃO NÃO CURARIZADA			PREPARAÇÃO CURARIZADA ($14,6 \times 10^{-3}$ mM)		
		Antes da P. nig.	Após a P. nig.	Porcentagem do Aumento	Antes da P. nig.	Após a P. nig.	Porcentagem do Aumento
1 ug/ml	30 min	3,0 cm	5,0 cm	66,0	3,0 cm	3,5 cm	16,6
		2,5 cm	3,5 cm	40,0	2,5 cm	2,5 cm	0,0
		3,0 cm	4,5 cm	50,0	2,5 cm	3,0 cm	20,0
		2,5 cm	4,0 cm	60,0	---	---	---
		3,5 cm	5,5 cm	57,1	---	---	---
		3,0 cm	5,0 cm	66,6	---	---	---
Média ± E.P.		2,91 ± 0,15	4,58 ± o,30	56,63 ± 4,16	2,66 ± 0,16	3,00 ± 0,28	12,22 ± 6,18
5 ug/ml	10 min	2,5 cm	4,0 cm	60,0	3,7 cm	3,7 cm	0,0
		3,5 cm	5,0 cm	42,8	3,1 cm	4,0 cm	29,0
		3,5 cm	5,0 cm	42,8	3,8 cm	5,0 cm	31,5
		3,5 cm	6,2 cm	77,1	3,4 cm	4,0 cm	17,6
		3,0 cm	4,5 cm	28,5	3,3 cm	4,5 cm	36,3
		3,5 cm	6,0 cm	71,4	---	---	---
		3,4 cm	6,5 cm	91,1	---	---	---
		3,5 cm	6,0 cm	71,4	---	---	---
		3,0 cm	5,5 cm	83,3	---	---	---
Média ± E.P.		3,26 ± 0,11	5,41 ± 0,28	63,15 ± 7,03	3,46 ± 0,12	4,24 ± 0,22	22,88 ± 6,49
25 ug/ml	3 min	3,5 cm	5,0 cm	42,8	3,0 cm	4,8 cm	60,0
		3,5 cm	6,5 cm	85,7	3,5 cm	5,0 cm	42,8
		3,0 cm	5,5 cm	57,1	3,0 cm	5,0 cm	66,6
		3,0 cm	5,5 cm	57,1	3,2 cm	5,3 cm	65,6
		2,5 cm	4,0 cm	60,0	---	---	---
		3,5 cm	6,0 cm	71,4	---	---	---
		3,0 cm	5,5 cm	83,3	---	---	---
		3,0 cm	5,5 cm	83,3	---	---	---
		3,0 cm	5,0 cm	66,6	---	---	---
Média ± E.P.		3,11 ± 0,11	5,38 ± 0,23	67,4 ± 4,9	3,17 ± 0,11	5,02 ± 0,10	58,75 ± 5,5

TABELA IV - AUMENTO DO RETARDO NO RELAXAMENTO DO "TWITCH" UTILIZANDO A PEÇONHA DE *Phoneutria nigriventer* NA PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE RATO

		PREPARAÇÃO NÃO CURARIZADA			PREPARAÇÃO CURARIZADA ($14,6 \times 10^{-3}$ mM)		
Dose	Tempo de Observação	Antes da P. nig.	Após a P. nig.	Porcentagem% do Aumento	Antes da P. nig.	Após a P. nig.	Porcentagem do Aumento
		0,20 cm	1,90 cm	850,0	0,20 cm	0,38 cm	90,0
1 ug/ml	50 min	0,25 cm	2,00 cm	700,0	0,25 cm	0,40 cm	60,0
		0,20 cm	1,90 cm	700,0	0,20 cm	0,35 cm	75,0
Média ± E.P.		0,21 ± 0,01	1,93 ± 0,03	750,0±49,44	0,21 ± 0,01	0,37 ± 0,01	75,0 ± 8,6
		0,20 cm	2,00 cm	900,0	0,25 cm	0,40 cm	60,0
		0,25 cm	2,00 cm	700,0	0,25 cm	0,70 cm	180,0
5 ug/ml	30 min.	0,30 cm	2,00 cm	566,6	0,20 cm	0,60 cm	200,0
		0,25 cm	1,90 cm	660,0	0,25 cm	0,65 cm	160,0
		0,20 cm	2,00 cm	900,0	0,20 cm	0,70 cm	250,0
Média ± E.P.		0,24 ± 0,02	1,98 ± 0,02	745,33±66,7	0,23 ± 0,01	0,61 ± 0,05	170,0±31,3
		0,20 cm	2,10 cm	950,0	0,25 cm	0,65 cm	160,0
25 ug/ml	10 min	0,20 cm	2,10 cm	950,0	0,30 cm	0,65 cm	116,6
		0,30 cm	2,00 cm	566,6	0,25 cm	0,70 cm	180,0
		0,20 cm	2,00 cm	900,0	0,25 cm	0,70 cm	180,0
Média ± E.P.		0,22 ± 0,02	2,05 ± 0,02	841,65±92,4	0,26 ± 0,01	0,675 ± 0,01	159,16±14,93

E.P. - Erro padrão

naquelas em que se adicionaram ao banho 25 ug/ml do veneno. Após o bloqueio, a estimulação direta (pulsos de 50 - 100 V, 2 mseg. e 0,1 Hz) do músculo provocou contração de menor tensão do que as iniciais (Fig.5).

O bloqueio neuromuscular causado pela peçonha não foi antagonizado pela Neo ($5,98 \times 10^{-3}$ mM) e pela 4-AP (0,37 mM). Entretanto, a adição da cálcio ($CaCl_2$ 10mM) ao banho restituiu parcialmente a transmissão neuromuscular (Fig. 6). Em solução de TYRODE com alto teor em cálcio ($CaCl_2$ 10mM), a peçonha não produziu bloqueio neuromuscular assim como não provocou contração tônica espontânea, retardo no relaxamento dos "twitches" e contrações fásicas espontâneas (Fig.7).

Nas preparações curarizadas (dTc = $14,6 \times 10^{-3}$ mM) estimuladas diretamente (pulsos de 50 - 100V, 2 mseg e 0,1 Hz) a peçonha nas concentrações de 1, 5 ou 25 ug/ml não produziu contrações fásicas espontâneas (Fig. 8). Em relação aos outros efeitos (contração tônica espontânea, aumento da tensão das respostas à estimulação e retardo em seu relaxamento), foi feita comparação da diferença entre as médias obtidas em preparações curarizadas e não curarizadas. A contração tônica espontânea somente ocorreu na preparação curarizada quando se utilizou a peçonha na concentração de 25 ug/ml (Tab. II), e esta foi significativamente menor em relação à não curarizada. O aumento da tensão das respostas a estimulação elétrica mostrou-se significativamente menor na preparação curarizada quando se utilizaram as concentrações de 1 e 5 ug/ml. Na de 25 ug/ml (Tab. III) a diferença das médias dos aumentos não foi significantemente diferente. A média do retardo no relaxamento causado pelas tres concentrações foi significativamente menor quando se empregaram preparações curarizadas (Tab. IV).

Em preparações bloqueadas com dTc ($1,46 \times 10^{-3}$ mM), o veneno de P. nig. (5 ug/ml) restituiu parcialmente a transmissão neuromuscular (Fig. 9).

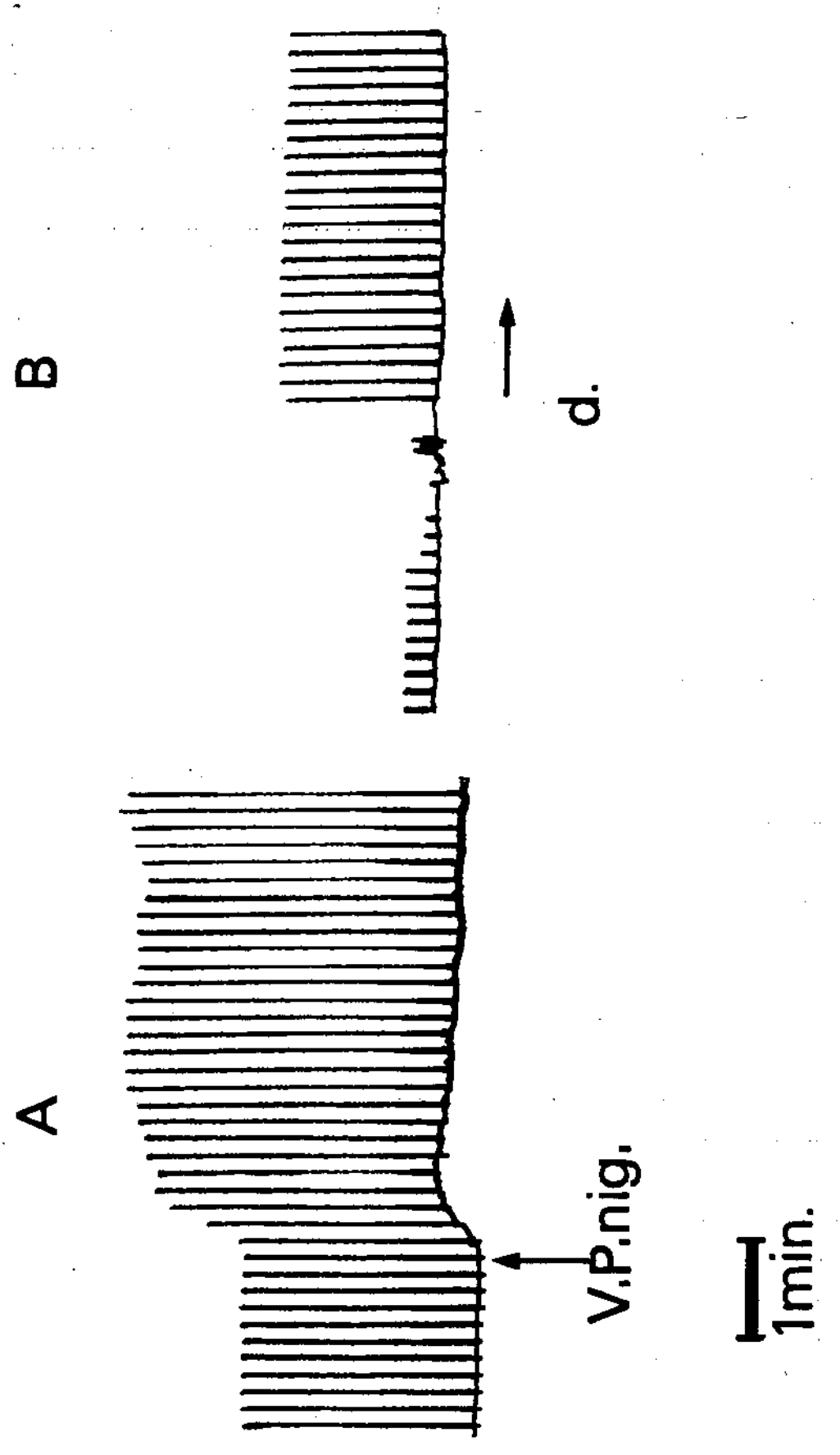

B
d.
A
V.P.nig.
1min.

Fig. 5: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (5 ug/ml) sobre as respostas do diafragma à estimulação indireta (pulsos maximais de 0,2 mseg e 0,1 Hz) e à estimulação direta (pulsos de 80 v, 2 mseg e 0,1 Hz).
Em A adição da peçonha. Em B 100min. após adição da peçonha, d- estimulação direta.

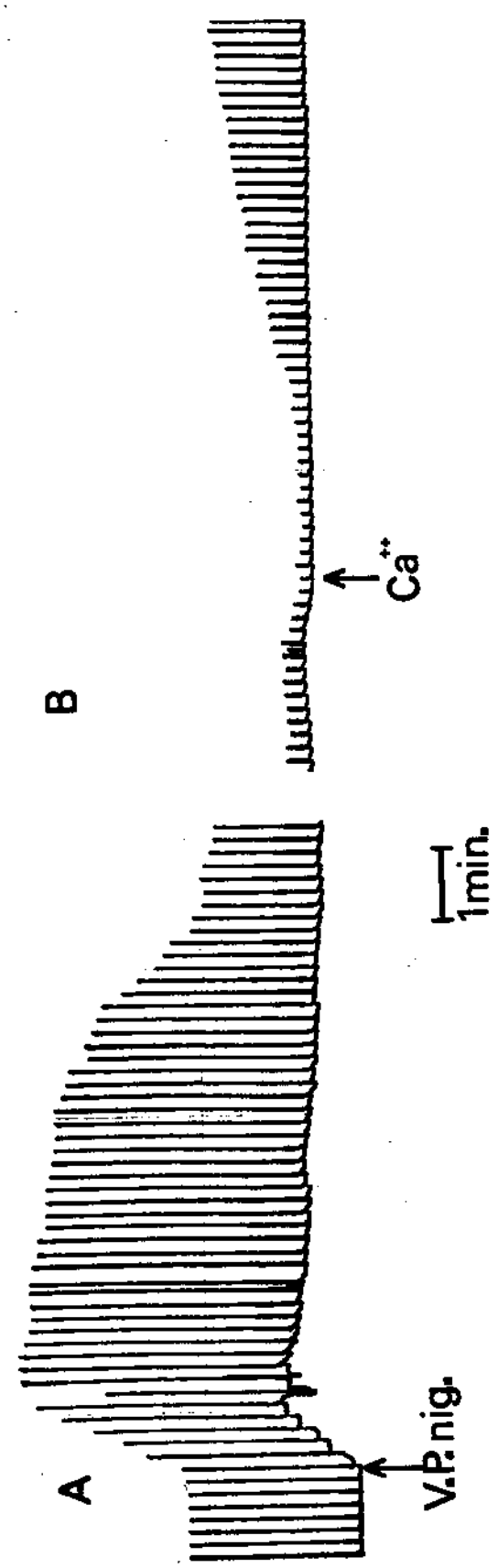

A
V.P.nig.
1min.
B
Ca++
C
N.Tyr.
D
Ca++
E

Fig. 6: Efeito do Ca^{++} ($CaCl_2$ 10mM) sobre o bloqueio neuromuscular causado pela peçonha de Phoneutria nigriventer (25 ug/ml), estimulação indireta (pulsos maximais de 0,2 mseg e 0,1 Hz).
Em A adição da peçonha. Em B, C, D e E respectivamente aos 35 min., 47 min., 58 min. e 108 min. após adição da peçonha.
Em B adição de $CaCl_2$ (10mM). Em C lavagens da preparação com TYRODE (remoção do excesso de Ca^{++}).
Em D nova adição de $CaCl_2$ (10mM).

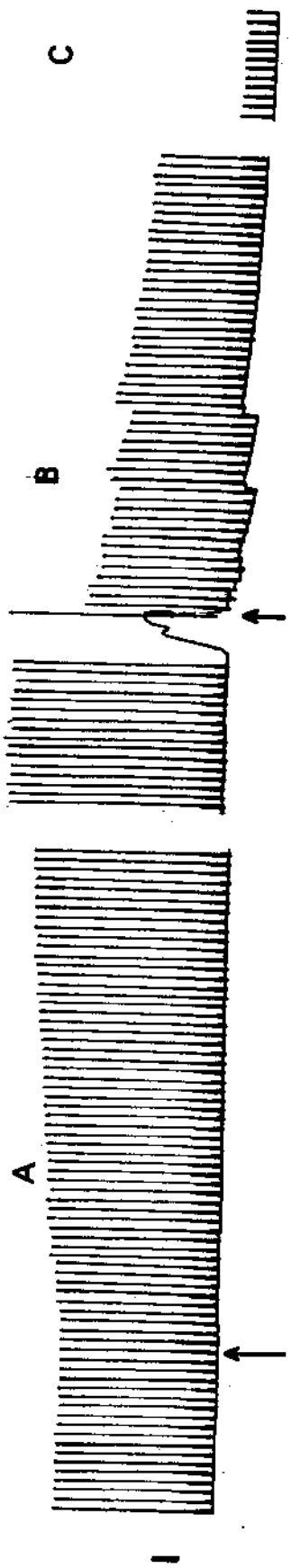


Fig. 7: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (25 ug/ml) sobre as respostas do diafragma à estimulação indireta (pulsos maximais de 0,2 mseg e 0,1 Hz) em presença de TYRODE com alto teor em cálcio ($CaCl_2$ 10 mM).
Em A adição da peçonha. Em B 40 min. após adição da peçonha, lavagem da preparação com TYRODE. Em C 100 min. após adição da peçonha.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

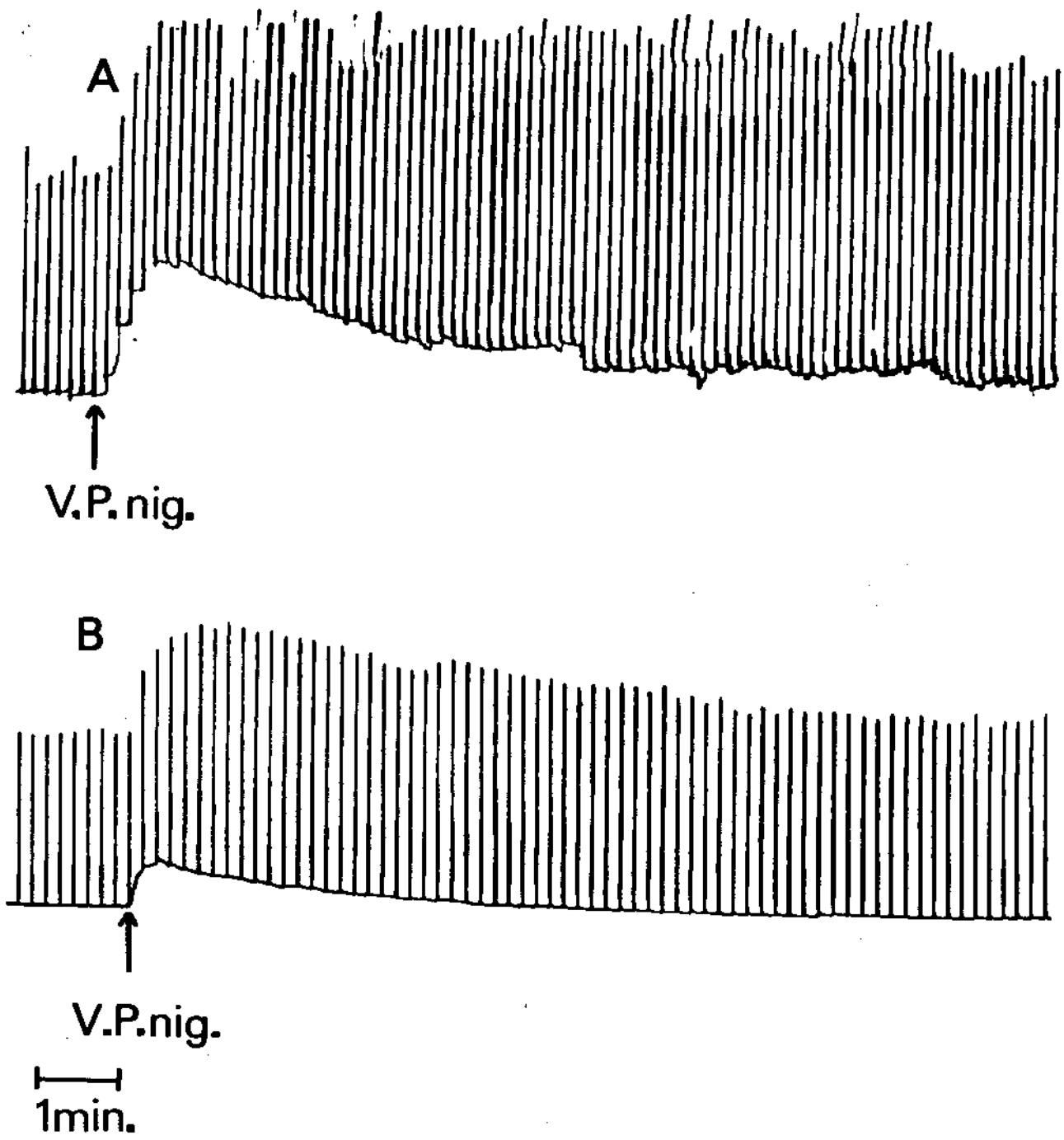


Fig. 8: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (25 ug/ml) sobre as respostas do diafragma à estimulação indireta A (pulsos maximais de 0,2 mseg e 0,1 Hz) e à estimulação direta B (pulsos de 85 V, 2 mseg e 0,1 Hz)
Em B preparação bloqueada previamente com d-tubo curarina ($14,6 \times 10^{-3}$ mM)

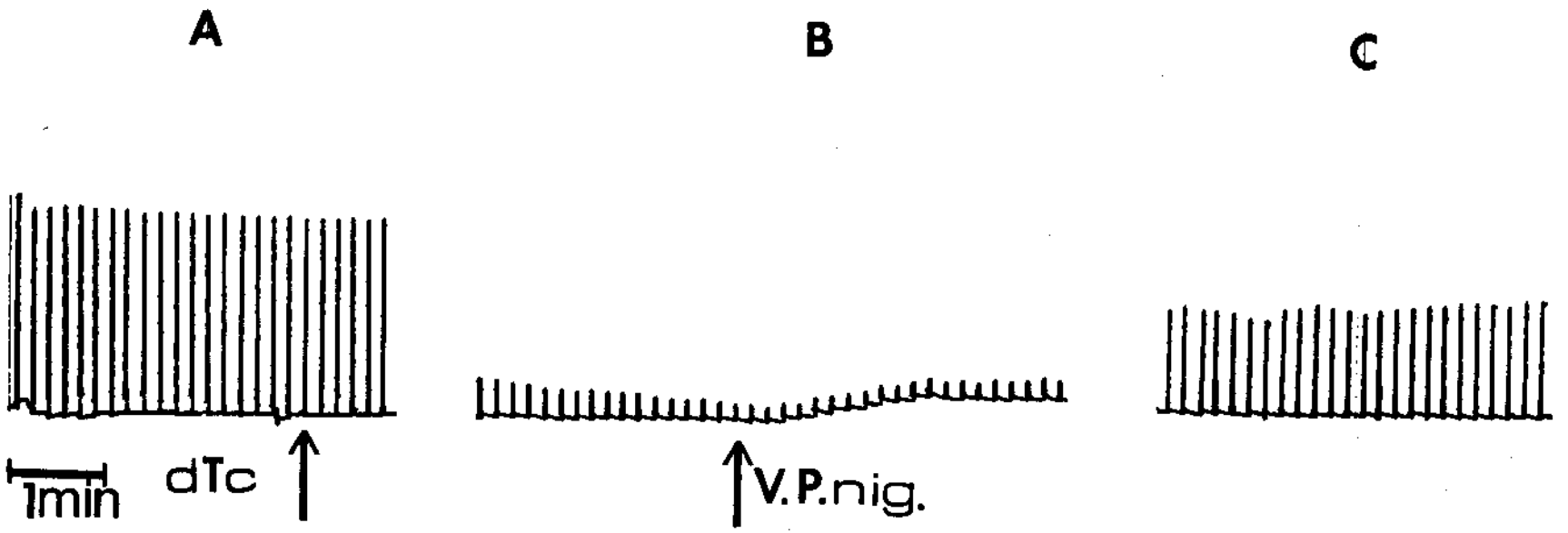


Fig. 9: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (5 ug/ml) sobre o bloqueio neuromuscular causado pela d-tubocurarina ($1,46 \times 10^{-3}$ mM) preparação nervo frênico-diafragma de rato, estímulos diretos com pulsos maximais de 0,2 mseg e 0,1 Hz.

Em A - adição de d-tubocurarina (dTc).

Em B - 25 min. após adição de d-tubocurarina e adição da peçonha de Phoneutria nigriventer.

Em C - 30 min. após adição da peçonha.

VII - 1.1. LIBERAÇÃO DE ACETILCOLINA

Os resultados das experiências, em que se estudou o efeito da peçonha sobre a liberação de acetilcolina estão contidos na Tab. V. A peçonha nas concentrações de 1, 5 ou 25 ug/ml causou aumento significativo na liberação espontânea da primeira hora, quando comparada à liberação espontânea controle. Quanto à liberação evocada, ocorreu diminuição significativa na primeira hora quando se utilizaram as concentrações de 5 e 25 ug/ml; na de 1 ug/ml a diminuição foi não significativa ao nível proposto. Na liberação da segunda hora, a espontânea, obtida nas concentrações de 1 ug/ml e 5 ug/ml de peçonha, continuou sendo significativamente maior do que a liberada antes da adição do veneno ao banho. Com o emprego de 25 ug/ml ocorreu diminuição significativa. A liberação evocada pela peçonha nas tres concentrações foi significativamente menor do que a controle.

A diferença das médias das liberações espontâneas da primeira hora, obtidas nas concentrações de 1 e 5 ug/ml, 1 e 25 ug/ml e 5 e 25 ug/ml de peçonha, foi não significativa. Na evocada, a diferença das médias das liberações nas experiências com as concentrações acima referidas somente não foi significativa com o uso de 1 e 5 ug/ml. Na liberação da segunda hora, a diferença das médias das liberações espontâneas, obtidas nas concentrações de 1 e 5 ug/ml, 1 e 25 ug/ml e 5 e 25 ug/ml de peçonha, foi significativa. A diferença das médias das liberações evocadas também revelou ser significativa nas experiências com o uso de 1 e 5 ug/ml e 1 e 25 ug/ml. Contudo, a diferença entre as médias com o emprego das concentrações 5 e 25 ug/ml de peçonha foi não significativa.

VII - 1.2 POTENCIAL DE REPOUSO

A adição da peçonha nas concentrações de 1, 5 ou 25 ug/ml determinou em todas as experiências despola-

TABELA V - LIBERAÇÃO DE ACETILCOLINA (ng)

Doses	Condições Controles		Peçonha de Phoneutria Nigriventer			
			Liberação 1a. Hora		Liberação 2a. Hora	
	Liberação Expontânea	Liber. Imp. Nervoso	Liberação Espontânea	Liber. Imp. Nervoso	Liberação Espontânea	Liber. Imp. Nervoso
	7,0	49,0	30,0	48,0	21,0	31,0
1 ug/ml	6,0	51,0	34,0	48,0	19,0	30,0
	7,0	50,0	35,0	50,0	20,0	30,0
Média ± E.P.	6,66 ± 0,33	50,0 ± 0,57	33,0 ± 1,52	48,66 ± 0,66	20,00 ± 0,57	30,33 ± 0,33
	6,50	52,0	29,0	47,0	12,0	18,0
5 ug/ml	7,0	50,0	30,0	45,0	10,0	17,0
	7,0	51,0	32,0	48,0	12,0	19,0
Média ± E.P.	6,83 ± 0,16	51,0 ± 0,57	30,33 ± 0,88	46,66 ± 0,88	11,33 ± 0,66	18,00 ± 0,57
	7,0	54,0	30,0	45,0	5,0	20,0
25 ug/ml	8,0	55,0	25,0	40,0	4,0	20,0
	7,0	52,0	20,0	40,0	2,0	15,0
Média ± E.P.	7,33 ± 0,33	53,66 ± 0,88	25,0 ± 2,88	41,66 ± 1,66	3,66 ± 0,88	18,33 ± 1,66

E.P. - Erro padrão

rização dose-dependente das fibras musculares na região das terminações nervosas (Tab. VI, regiões 1 e 2, da Fig. 10). O cálcio (10mM) antagonizou parcialmente a despolarização ocorrida. Nas regiões distantes das terminações nervosas, o potencial de membrana alterou-se muito pouco (Tab. VI, regiões 4 e 5, fig. 10). Em preparações curarizadas (dTc 14,6 x 10^{-3} mM) também ocorreu despolarização somente na região das terminações nervosas. A TTX (3 x 10^{-3} mM) antagonizou-as (Tab. VII). Em soluções de TYRODE pobres em sódio (5 mM), a peçonha não alterou o potencial de repouso. Contudo, ao substituí-la por solução de TYRODE com teor normal em sódio (137 mM) a despolarização foi marcante. Esta desapareceu quando novamente colocou-se em presença da solução nutritiva modificada (Fig. 11).

Realizaram-se ainda experiências com preparações previamente bloqueadas com a α-bungarotoxina (0,6 x 10^{-3}mM). Nessas, a peçonha nas concentrações de 1 ou 5 ug/ml também despolarizou apenas as regiões das terminações nervosas (Tab. VIII).

4722/78

VII - 1.3 POTENCIAL DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA (p.p.t.m.)

Em todas as experiências, e em todas as concentrações, a peçonha (1, 5 ou 25 ug/ml) causou aumento na amplitude e frequência dos ps.p.t.m.. O intervalo de tempo entre a adição da peçonha e o aparecimento do aumento na frequência foi dose-dependente: 70 min. $\pm$ 8,6 com o uso de 1 ug/ml; 30 min. $\pm$ 5,0 com o de 5 ug/ml e 15 min. $\pm$ 9,4 com o uso de 25 ug/ml. A TTX (3 x 10^{-3} mM) condicionou a volta da frequência dos ps.p.t.m. ao normal mesmo quando adicionado ao banho em momento em que eram incontáveis (Fig.12). Nas Figs. 13, 14 e 15 podem-se verificar as alterações nas médias da amplitude dos p.p.t.m obtidas em experiências com o emprego das tres concentrações (1, 5 e 25 ug/ml) da peçonha.

TABELA VI - EFEITO DA PEÇONHA DE *Phoneutria nigriventer* sobre o POTENCIAL DE MEMBRANA

Dose	$CaCl_2$	Tempo (mim)	Potencial de Membrana (mV) Região 1 e 2	Região 4 e 5
		0	81,6 ± 0,33	82,3 ± 0,33
1 ug/ml		60	69,3 ± 0,88	77,0 ± 0,57
		120	62,6 ± 1,45	75,3 ± 0,33
	10 mM	20	76,3 ± 1,55	----
		0	82,3 ± 0,33	83,6 ± 0,33
5 ug/ml		60	63,3 ± 1,76	76,5 ± 0,28
	10 mM	120	56,0 ± 1,15	71,0 ± 0,57
		20	72,0 ± 2,44	----
		0	85,3 ± 0,33	86,6 ± 0,60
25 ug/ml		60	56,0 ± 1,15	76,2 ± 0,26
		120	45,3 ± 0,33	72,6 ± 0,33
	10 mM	20	67,8 ± 3,91	----

Potencial de Membrana = média de 3 experiências ± erro padrão

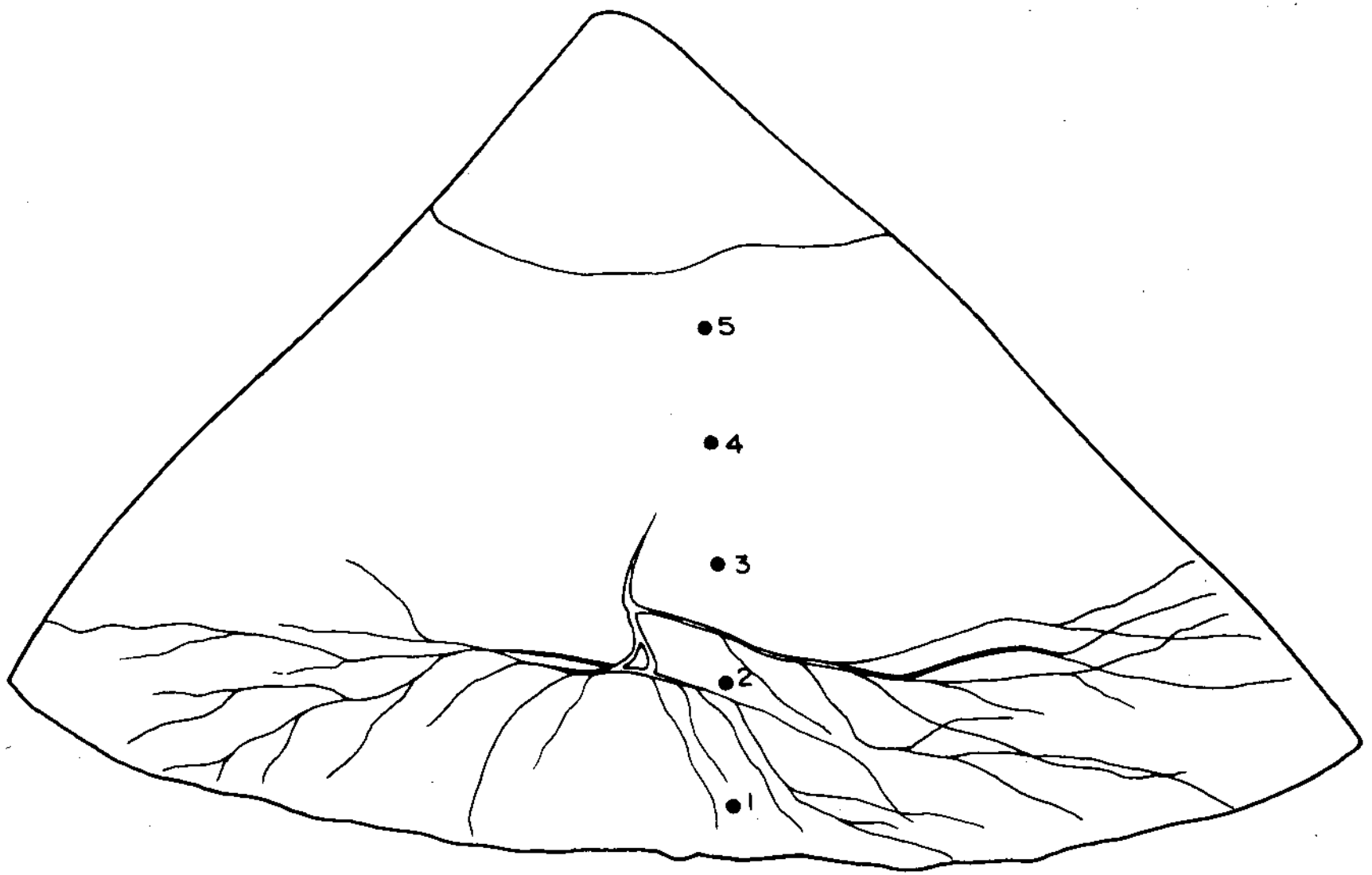


Fig. 10: Esquema do diafragma de rato, ampliado de 4 vezes, mostrando as regiões (1, 2, 3, 4 e 5) onde foram determinados os potenciais de repouso.

TABELA VII - EFEITO DA PEÇONHA DE *Phoneutria nigriventer* SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA EM PREPARAÇÃO BLOQUEADA PELA d-TUBOCURARINA

Dose	TTX	tempo (minutos)	Potencial de Membrana de Diafragma de Rato (mV)				
			Região 1	Região 2	Região 3	Região 4	Região 5
		0	82,3 ± 1,9	82,1 ± 1,5	82,0 ± 1,5	82,9 ± 1,8	83,0 ± 1,8
1 ug/ml		15	75,3 ± 2,3	79,6 ± 2,4	79,3 ± 3,2	80,0 ± 1,4	80,0 ± 1,4
		30	72,8 ± 2,1	68,5 ± 2,0	80,6 ± 1,4	80,6 ± 1,3	80,1 ± 1,3
		60	68,3 ± 1,5	63,3 ± 1,9	79,3 ± 1,3	79,3 ± 1,7	79,0 ± 1,9
	3×10^{-3} mM	30	80,9 ± 1,9	82,7 ± 2,4	81,6 ± 1,8	81,5 ± 2,3	81,0 ± 2,3
		0	81,9 ± 2,1	82,4 ± 2,5	83,2 ± 1,9	82,3 ± 2,1	82,6 ± 1,7
5 ug/ml		15	74,0 ± 2,0	69,2 ± 1,4	79,2 ± 1,8	79,8 ± 1,9	80,0 ± 1,5
		30	71,0 ± 1,9	63,7 ± 1,7	78,4 ± 1,2	78,9 ± 1,8	79,5 ± 1,8
		60	62,2 ± 2,4	59,1 ± 1,8	76,0 ± 2,1	77,3 ± 1,2	77,0 ± 1,4
	3×10^{-3} mM	30	80,1 ± 1,8	82,1 ± 1,7	82,8 ± 1,9	81,8 ± 2,1	81,6 ± 2,0
		0	79,5 ± 1,8	81,3 ± 1,9	81,7 ± 1,5	82,0 ± 1,9	82,4 ± 1,4
25 ug/ml		15	70,2 ± 2,5	67,6 ± 2,1	73,4 ± 1,6	78,3 ± 1,8	79,1 ± 1,3
		30	61,5 ± 2,0	56,6 ± 1,8	69,5 ± 1,6	77,1 ± 1,7	78,1 ± 1,8
		60	58,9 ± 1,7	50,8 ± 1,4	67,1 ± 1,7	75,0 ± 1,6	76,2 ± 2,1
	3×10^{-3} mM	30	79,5 ± 2,3	79,7 ± 1,8	79,8 ± 2,1	81,5 ± 1,9	81,0 ± 2,1

Potencial de Membrana = média de 3 experiências ± erro padrão

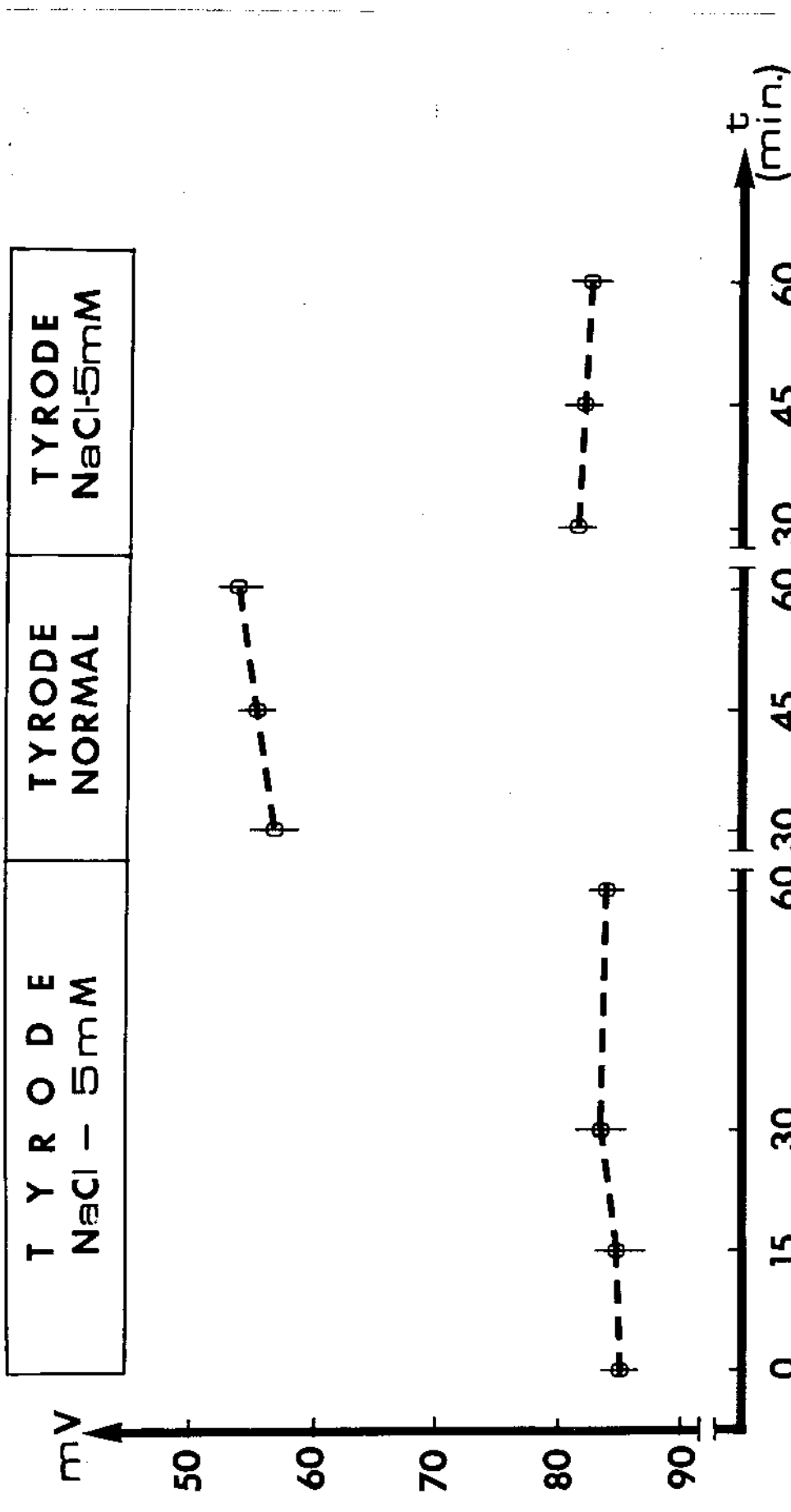
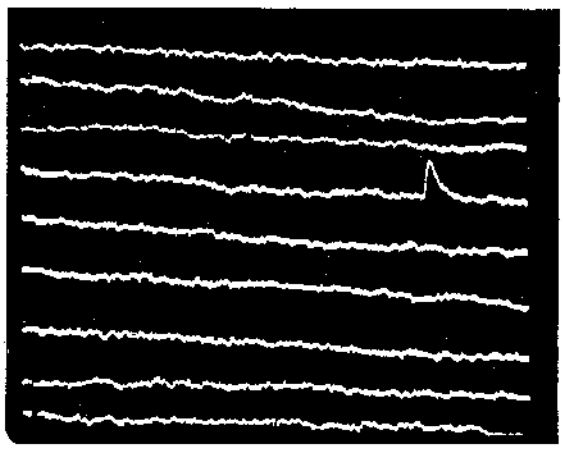


Fig. 11: Efeito do sódio (Na^+) sobre à ação despolarizante da peçonha de Phoneutria nigriventer (25 ug/ml). Cada ponto representa a média de 3 experiências com o seu respectivo erro padrão.

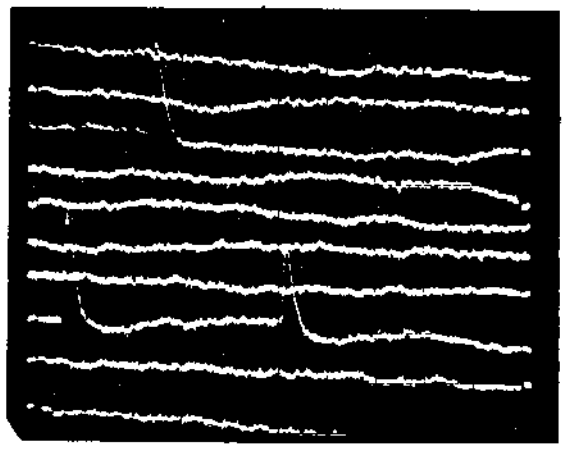
TABELA VIII - EFEITO DA PEÇONHA DE *Phoneutria nigriventer* SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA EM PREPARAÇÃO BLOQUEADA COM α-BUNGAROTOXINA 5 ug/ml.

Peç.de Ph. nigriventer	Tempo	Potencial de Membrana de Diafragma de Rato (mV)				
		Região 1	Região 2	Região 3	Região 4	Região 5
1 ug/ml	0	84,0 ± 1,4	82,3 ± 1,0	83,5 ± 1,7	82,0 ± 1,3	83,2 ± 1,8
	15	77,8 ± 1,2	76,3 ± 1,8	80,8 ± 2,1	81,5 ± 1,9	82,2 ± 2,5
	30	75,6 ± 1,8	71,0 ± 1,0	80,3 ± 2,4	80,3 ± 2,1	81,5 ± 1,4
	60	68,0 ± 1,3	64,6 ± 1,8	78,8 ± 1,9	79,3 ± 2,0	80,0 ± 2,6
5 ug/ml	0	84,0 ± 2,4	83,6 ± 2,1	83,5 ± 1,7	83,0 ± 1,5	83,5 ± 1,9
	15	80,0 ± 1,7	79,0 ± 1,9	81,0 ± 2,3	81,6 ± 1,9	81,0 ± 2,4
	30	76,6 ± 1,9	73,3 ± 1,4	79,0 ± 1,8	80,0 ± 2,3	79,0 ± 1,4
	60	66,0 ± 2,3	60,0 ± 1,8	76,0 ± 2,1	78,0 ± 2,1	78,0 ± 1,7

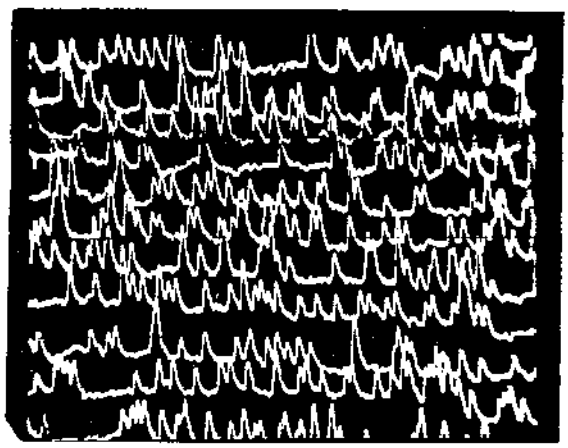
Potencial de Membrana = média de 3 experiências ± erro padrão



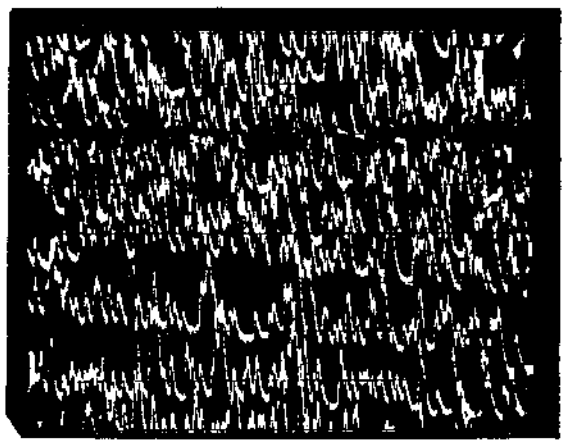
I



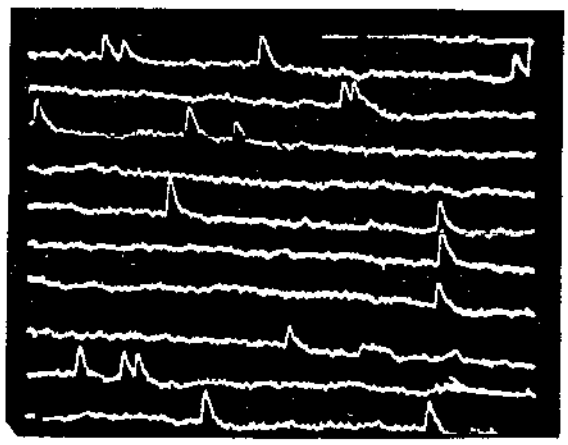
II



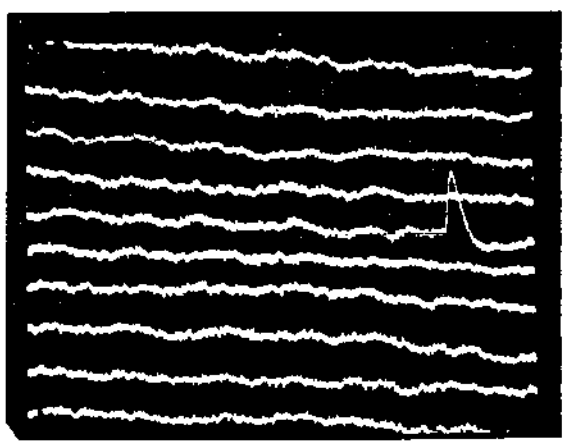
III



IV



V



VI

0,5mV

10m sec

Fig. 12: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (5 ug/ml) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (preparação nervo frênico-diafragma de rato)
Em I controle, II, III e IV respectivamente aos 10, 20 e 30 min. após adição da peçonha.
Em IV adição de tetrodotoxina (3.10^{-3} mM).
Em V 5 min. após adição de tetrodotoxina.
Em VI 15min. após IV.

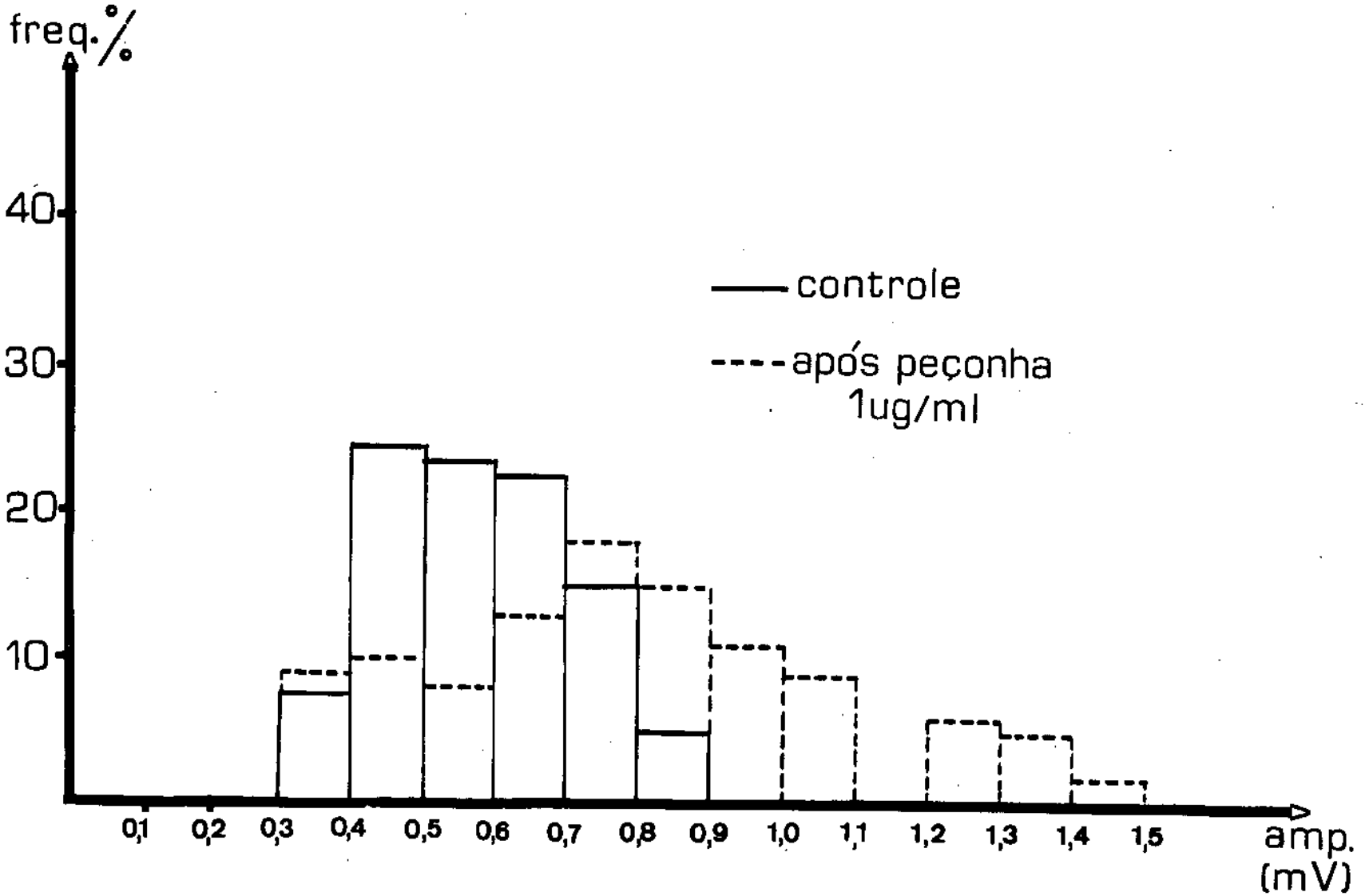

freq.%
40
30
20
10
controle
após peçonha
1ug/ml
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1,0
1,1
1,2
1,3
1,4
1,5
amp.
(mV)

Fig. 13: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (1 ug/ml) sobre a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura. Nas abcissas a amplitude em milivolts (mV) dos potenciais de placa terminal em miniatura. Nas ordenadas a percentagem de sua frequência relativa ao total dos potenciais de placa terminal em miniatura

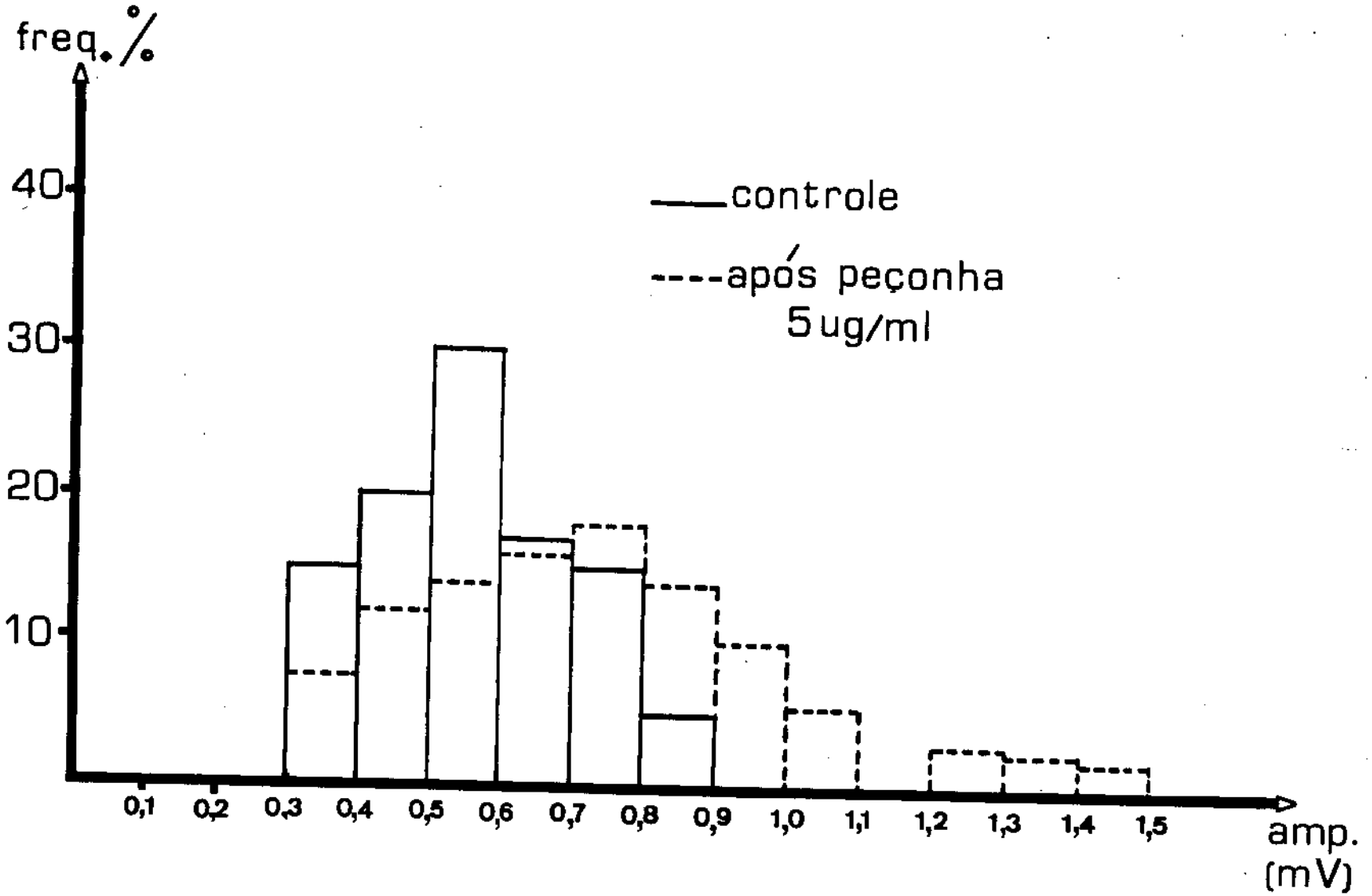

freq. %
40
30
20
10
——controle
----após peçonha
5ug/ml
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1,0
1,1
1,2
1,3
1,4
1,5
amp.
(mV)

Fig. 14: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (5 ug/ml) sobre a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura. Nas abcissas a amplitude em milivolts (mV) dos potenciais de placa terminal em miniatura. Nas ordenadas a porcentagem de sua frequência relativa ao total dos potenciais de placa terminal em miniatura

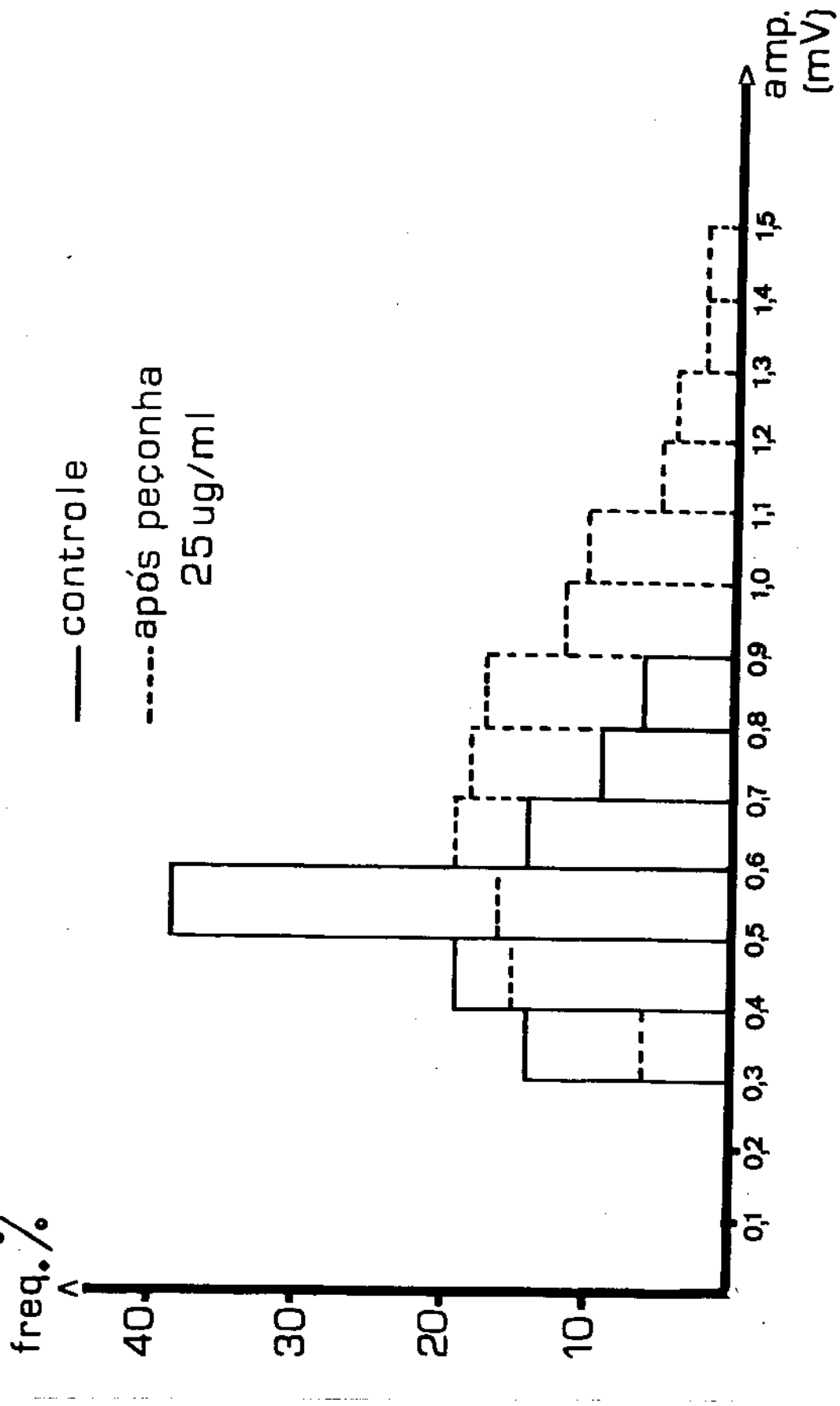

freq. %
40
30
20
10
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1,0
1,1
1,2
1,3
1,4
1,5
amp. (mV)
controle
após peçonha 25 ug/ml

Fig. 15: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (25 ug/ml) sobre a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura. Nas abcissas a amplitude em milivolts (mV) dos potenciais de placa terminal em miniatura. Nas ordenadas a porcentagem de sua frequência relativa ao total dos potenciais de placa terminal em miniatura

VII - 1.4 POTENCIAL DE PLACA TERMINAL (p.p.t.)

No estudo do efeito da peçonha de P. nig. sobre o p.p.t. utilizou-se somente a concentração de 5 ug/ml.. Verificou-se que após 28 ± 4min., a cada estímulo elétrico aplicado sobre o nervo apareciam vários ps.p.t. em rápida sucessão (Fig. 16). Verificou-se também que a peçonha não reduz a amplitude dos ps.p.t. e que estes desaparecem abruptamente.

VII - 1.5 POTENCIAL DE AÇÃO

A cada estímulo elétrico aplicado sobre o nervo apareceram vários potenciais de ação em sucessão, quando a peçonha nas concentrações de 1, 5 ou 25 ug/ml estava em contacto com a preparação (Fig. 17). O intervalo de tempo entre a adição da peçonha e o aparecimento das descargas iterativas de potenciais de ação foi dose-dependente, ou seja, com 1 ug/ml 75 ± 6 min., com 5ug/ml 30 ± 5 min. e com 25 ug/ml 15 ± 4 min. Não se observaram alterações na duração dos potenciais de ação.

Em preparações não estimuladas, registraram-se descargas iterativas de potenciais de ação espontâneos (Fig. 18) coincidentes com contrações espontâneas do músculo. À cada potencial em agulha, seguia-se potencial negativo posterior que deflagrava outro potencial em agulha.

VII - 2 PREPARAÇÃO HEMIDIAFRAGMA CRONICAMENTE DESNERVADO DO RATO.

A peçonha nas concentrações de 1 e 5 ug/ml não produziu efeitos. Contudo, na de 25 ug/ml, causou ligeira contratura e inibiu irreversivelmente as respostas do músculo à estimulação elétrica (pulsos de 50 - 100 V, 2 mseg, 0,1 Hz). Não produziu os outros efeitos - aumento da tensão dos "twitches", retardo no seu relaxamento, contrações fásicas es-

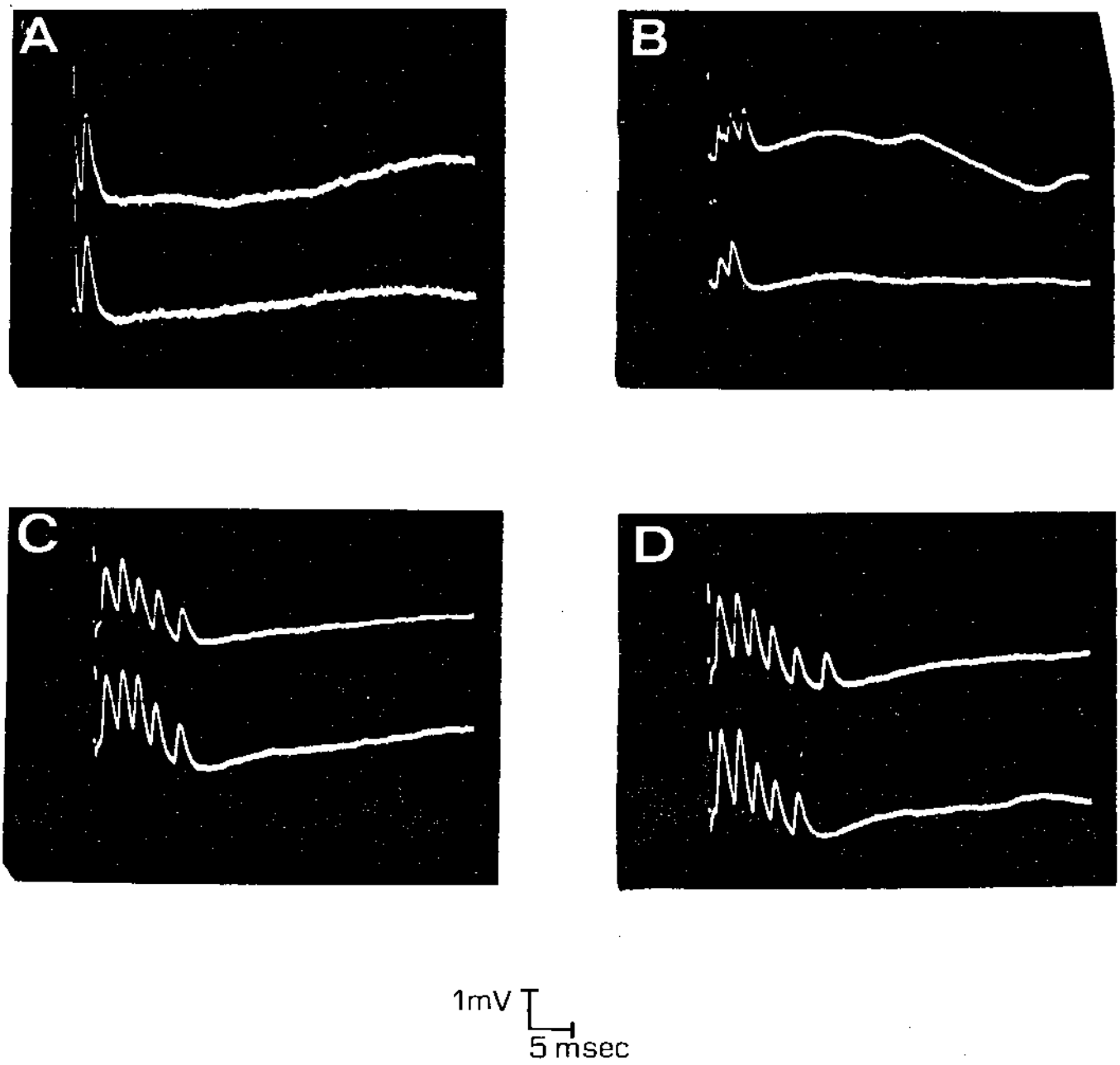


Fig. 16: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (5 ug/ml) sobre os potenciais de placa terminal (preparação nervo frênico-diafragma de rato, bloqueada com 0,73 x 10^{-3} mM de d-tubocurarina.
A - controle; B, C e D respectivamente 25,30 e 40 min. após adição da peçonha.

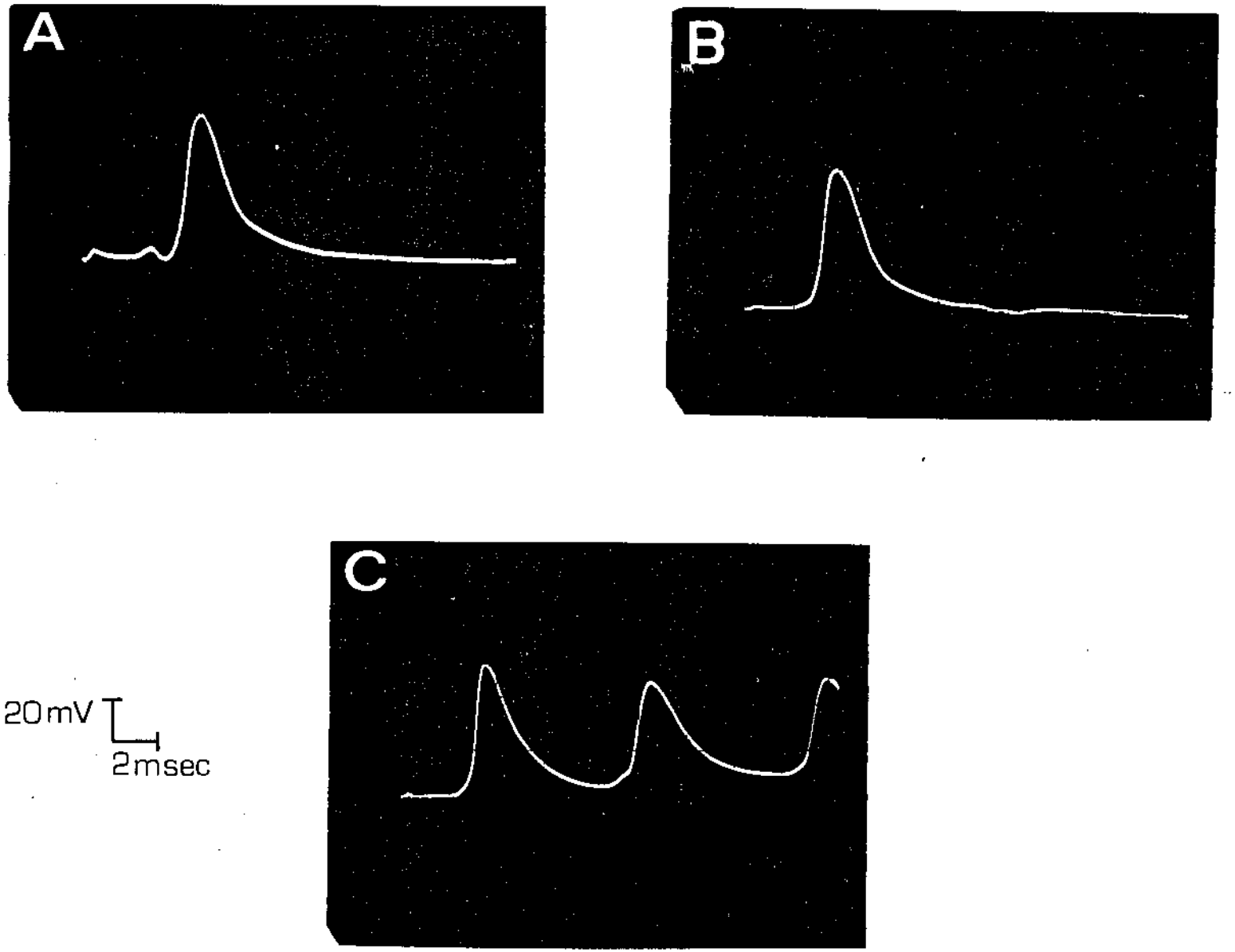
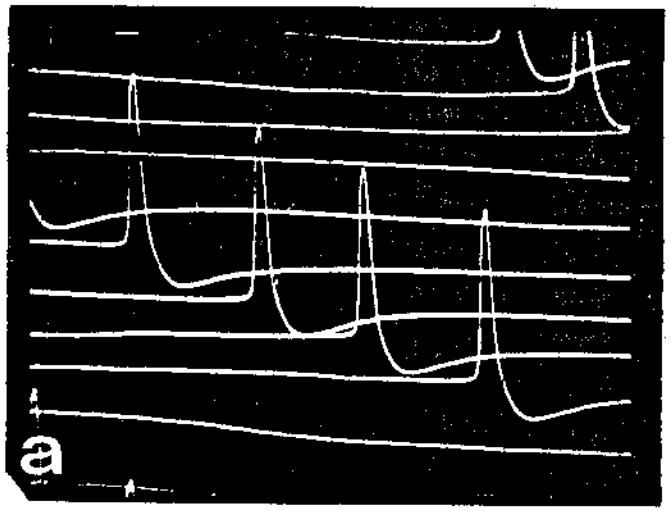
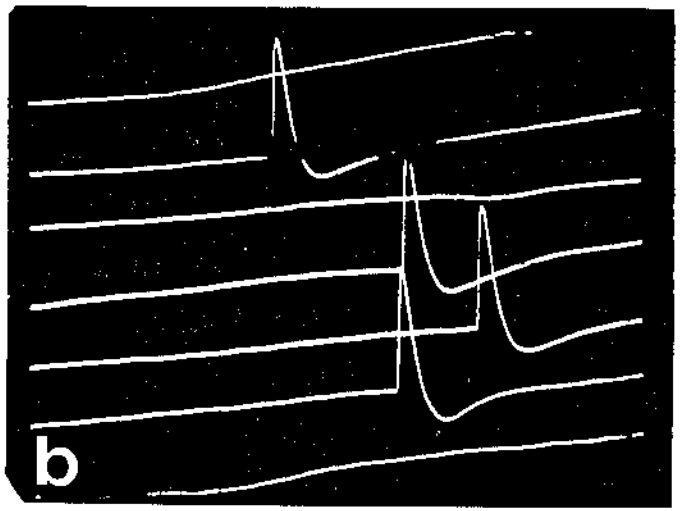
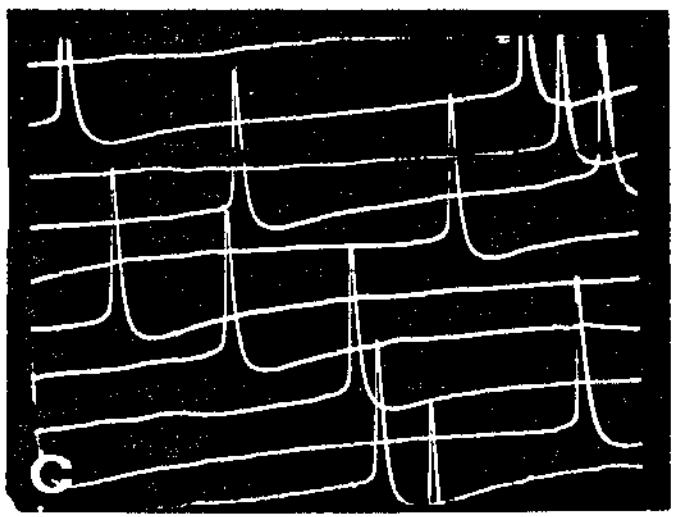

A
B
C
20mV
2msec

Fig. 17: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (5 ug/ml) sobre potenciais de ação (preparação nervo frênico-diafragma de rato, estimulada indiretamente).
A - controle; B e C respectivamente 15 e 30 min. após adição da peçonha.





20mV
5msec



10mV
10msec

Fig. 18: Descargas iterativas espontaneas de potenciais de ação em diafragma submetido à ação da peçonha de Phoneutria nigriventer.
Em a - 1 ug/ml;
Em b - 5 ug/ml e
Em c - 25 ug/ml da peçonha

pontâneas - Observados no diafragma inervado. O íon cálcio ($CaCl_2$ 10 mM) antagonizou parcialmente a depressão das respostas aos estímulos elétricos (Figs. 19 e 20). A peçonha inibiu também a contratura provocada pela acetilcolina ($14,6 \times 10^{-3}$ mM) e pelo potássio (26×10^{-3} mM). O bloqueio das respostas à ACh foi ireversível ao passo que lavagens sucessivas da preparação restauraram a tensão da contratura produzida pelo potássio (fig. 21). O íon cálcio ($CaCl_2$ 10mM) antagonizou totalmente a inibição da contratura causada pela ACh (Fig. 19) e parcialmente a da produzida pelo potássio (Fig. 20).

Com a mesma preparação também foram realizadas experiências sobre o efeito da peçonha no potencial de repouso. Nessas, a peçonha na concentração de 25 ug/ml, após 60 min. da sua adição, não alterou o potencial de membrana (Tab. IX).

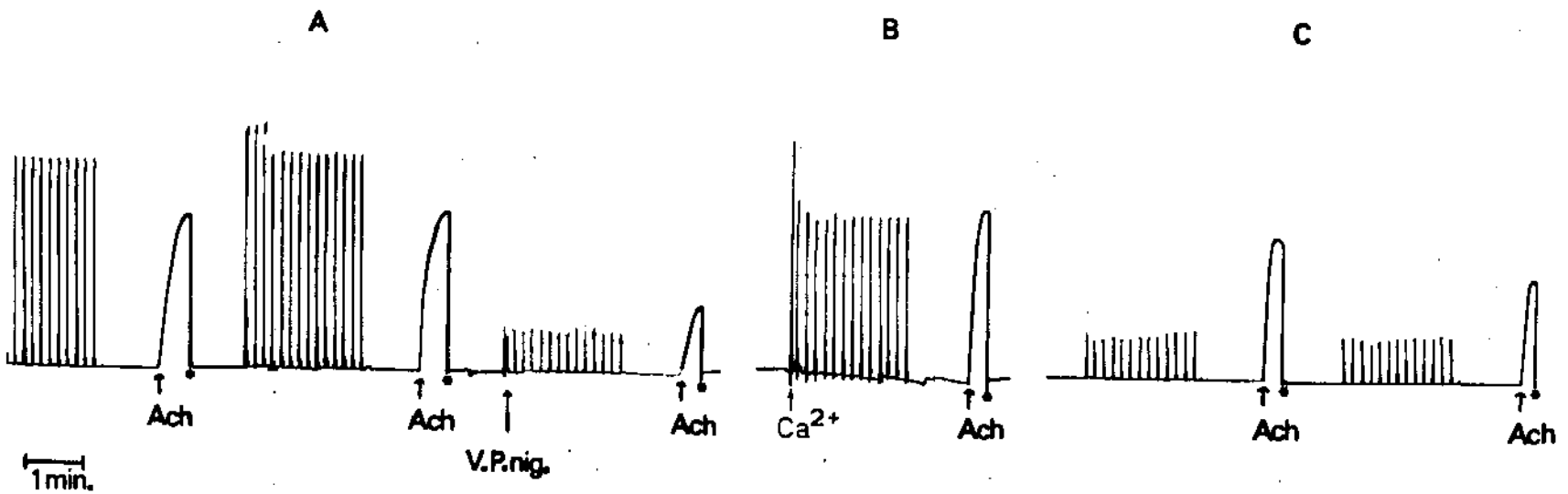


Fig. 19: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (25 ug/ml) sobre as respostas da preparação hemidiafragma cronicamente desnervado de rato à estimulação eletrica direta (pulsos de 70 V, 2 mseg e 0,1 Hz) e à acetilcolina ($14,6 \times 10^{-3}$ mM).
Em A - antes e após 30 min. da adição da peçonha ao banho. Em B - após 15 min. da adição de $CaCl_2$ (1o mM) e em C - após sucessivas lavagens da preparação com TYRODE.
* lavagem da preparação.

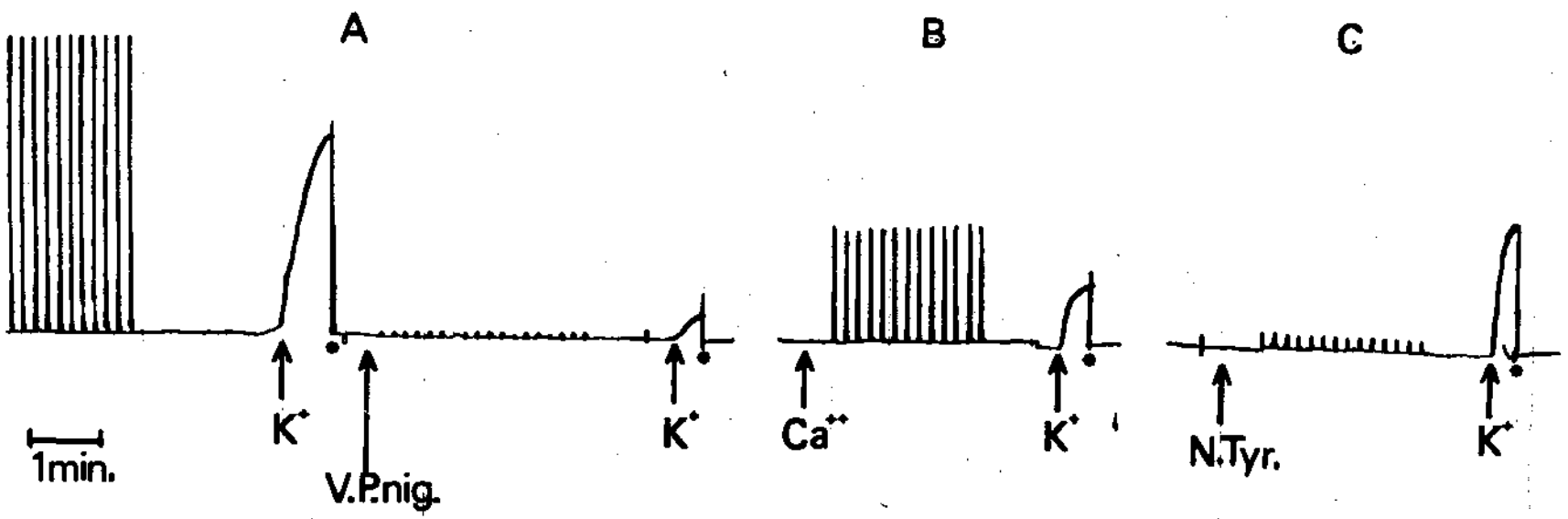


Fig. 20: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (25 ug/ml) sobre as respostas da preparação hemidiafragma cronicamente desnervado do rato à estimulação eletrica direta (pulsos de 85 V, 2 mseg e 0,1Hz) e ao K^+ (KCl 26 x 10^{-3} mM).
Em A- antes e após 30 min. da adição da peçonha ao banho. Em B- após 15 min. da adição de CaCl2 (10mM) e em C após sucessivas lavagens da preparação com TYRODE.

* lavagem da preparação

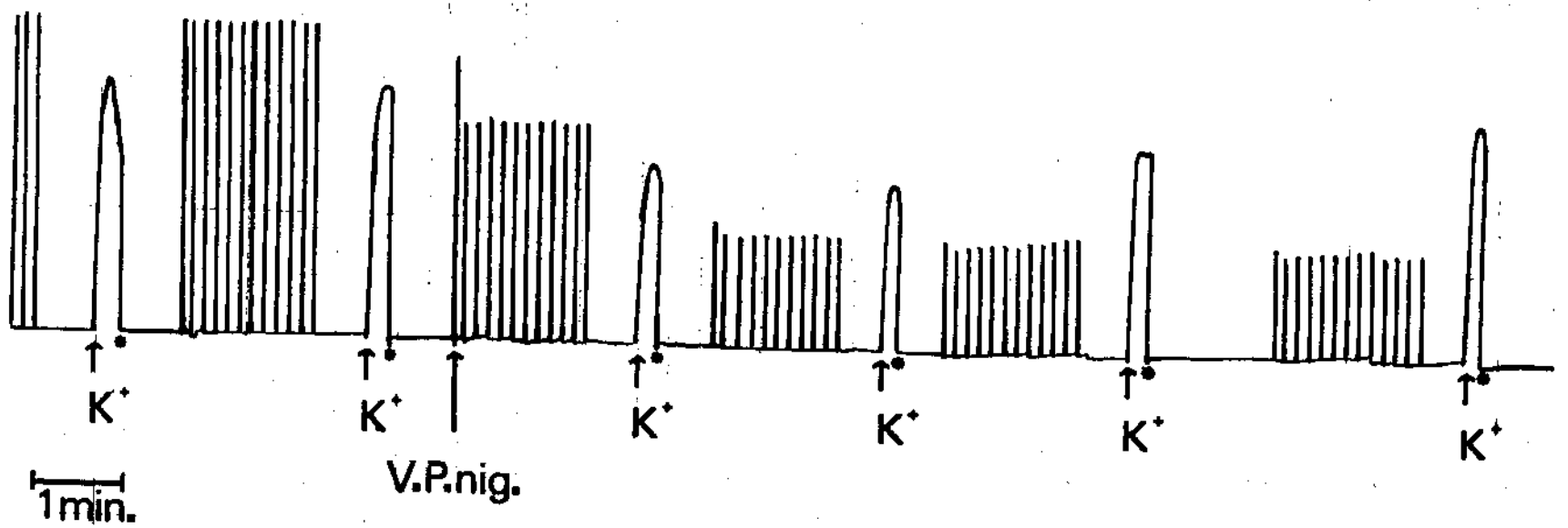


Fig. 21: Efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer (25 ug/ml) sobre as respostas da preparação hemidiafragma cronicamente desnervado do rato à estimulação elétrica direta (pulsos de 80 V, 2 mseg e 0,1Hz) e ao K^+ (KCl 26 x 10^{-3} mM).
Em V.P. nig. adição da peçonha (30min. em contacto com a preparação)

* lavagem da preparação

TABELA IX - EFEITO DA PEÇONHA DE Phoneutria nigriventer SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NO DIAFRAGMA CRONICAMENTE DESNERVADO (mV)

	Peçonha de Phoneutria nigriventer (25 ug/ml)						
Exp. nº	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
1	55,6	57,4	58,4	57,4	57,4	58,4	57,4
2	67,2	68,0	67,2	66,3	66,0	64,7	67,6
3	66,0	67,0	67,0	66,0	67,0	66,0	66,0

VIII - DISCUSSÃO

De tres modos podem as toxinas atuar no canal do sódio: bloqueando-o, retardando o seu fechamento ou ativando-o. Bloqueiam seletivamente o sódio ionóforo, a tetrodotoxina (NARAHASHI et al, 1960) e a saxitoxina (NARAHASHI et al, 1967). Várias toxinas polipeptídicas como as α-escorpionicotoxinas da peçonha dos escorpiões pertencentes à sub-família BUTHINAE do norte da África e Ásia e as das anêmonas do mar retardam a inativação do canal do sódio (KOPPENHÖFER e SCHIMIDT, 1968a, 1968b; NARAHASHI, 1969, 1972; MURAYAMA et al, 1972). Prolongam, em conseqüência, a duração do potencial de ação. Contudo algumas também encerram toxinas que ativam o canal do sódio como por exemplo a de Leiurus quinquestriatus (CAHALAN, 1980). Despolarizam a membrana de células eletricamente excitáveis além de prolongar a duração do potencial de ação (ADAM e WEISS, 1966; ADAM et al, 1966). A tityustoxina, uma das toxinas da peçonha de Tityus serrulatus prolonga, pelo menos em concentrações elevadas a duração do potencial de ação. (WARNICK et al, 1976). Atua, pois, de modo semelhante ao das α-escorpionicotoxinas. Contudo a peçonha de Tityus serrulatus não altera a duração do potencial de ação (VITAL BRAZIL, resultados inéditos). O mecanismo de ação da maioria de suas toxinas deve, pois, ser semelhante ao das β-escorpionicotoxinas.

As toxinas polipeptídicas, crotamina (PELLEGRINI FILHO et al, 1978) da peçonha de cascavel sulamericana e β escorpionicotoxinas da peçonha de escorpiões Centruroides da America do Norte (COURRAUD et al, 1982); CAHALAN, 1975) ativam o canal do sódio sem interferir com o seu fechamento. Compostos policiclicos, lipossolúveis (batracotoxina, vários alcaloides do veratrum, aconitina, graianotoxina) também atuam ativando o sódio ionóforo. A veratrina (KRAYER e ACHESON, 1946), a β-escorpionicotoxina e a crotamina (VITAL BRAZIL et al, 1979) em virtude da ação no canal do sódio provocam descargas iterativas de potenciais de ação. Contudo a batracotoxina não o faz, causando, ao contrário daquelas toxinas, contratura e depressão das respostas à estimulação indireta ou direta do músculo

(WARNICK et al, 1971). Este fato parece achar-se ligado ao número dos sódio ionóforos ativados e à sua distribuição na membrana de celulas eletricamente excitável. CATTERALL (1979) verificou com efeito que a batracotoxina ativa 95% dos canais do sódio na membrana de neuroblastos (clone N18 neuroblastoma C 1300 de camundongos) enquanto a veratrina o faz em apenas 8%. Por outro lado VITAL BRAZIL e FONTANA (1982) constataram que a veratrina e a crotamina despolarizam somente ou com maior intensidade a região das terminações nervosas do diafragma de rato e que pequenos aumentos na concentração do ion potássio na solução nutritiva aumenta a despolarização na região parcialmente despolarizada sem afetar as outras. Sugeriram, pois, que a distribuição desigual dos sódio ionóforos ativados pela veratrina e crotamina e o efluxo do potássio que ocorre na fase de repolarização do potencial em agulha causam despolarização local (potencial posterior negativo) da membrana das fibras musculares responsável pelas descargas iterativas dos potenciais de ação. A crotamina e as β-escorpionicotoxinas ao contrário da veratrina, produzem também descargas iterativas espontâneas de potenciais de ação. Este efeito é atribuido a desvio na voltagem dependência de ativação do sódio-ionóforo para potenciais de membrana mais negativos (CAHALAN, 1980) próximos ou iguais ao potencial de repouso. Assim, uma fração dos canais do sódio pode ser ativada na ausência de despolarização da membrana, dando origem a potencial de ação cujo potencial posterior negativo deflagrará, por sua vez, outro potencial de ação, repetindo-se o processo até a extinção da hiperexcitabilidade da membrana. Na presente pesquisa verificou-se que a peçonha de Ph. nigriventer ativa o canal do sódio. A despolarização, com efeito, que produziu no diafragma de rato foi inibida tanto pela tetrodotoxina (tab. VII) como pela diminuição do teor em sódio na solução nutritiva (fig. 11). A ativação dos canais do sódio pela peçonha também foi evidenciada no estudo de seu efeito sobre os potenciais de placa terminal em miniatura: a tetrodotoxina antagonizou o seu efeito sobre a freqüência desses potenciais (fig.12). Mesmo em concentrações elevadas (25 ug/ml) a peçonha não aumentou a duração do potencial de ação (fig. 17). Pode-se inferir,

pois, que não interfere com o fechamento do sódio-ionóforo.Por outro lado, condiciona o aparecimento de descargas iterativas espontâneas de potenciais de ação (fig. 18) o que sugere atuar também causando desvio da voltagem dependência de ativação do canal do sódio para potenciais mais negativos. A distribuição dos sódio-ionóforos ativados pela peçonha, veratrina e crotamina é a mesma. Compreende a faixa costal do diafragma onde se localizam as terminações nervosas do nervo frênico (fig. 10). A verificação presente e anterior (VITAL BRAZIL e FONTANA,1982) dessa distribuição foi levada a efeito em diafragmas bloqueados com concentração elevada de dTc ($14,6 \times 10^{-3}$mM) ou α-bungarotoxina ($0,6 \times 10^{-3}$mM) cuja ação é irreversível. Excluem portanto uma participação direta ou indireta (através de liberação do neurotransmissor) na gênese do efeito despolarizante. Como a veratrina (KUFFLER,1945) a peçonha aumenta e prolonga o potencial posterior negativo (fig. 18), causa das descargas iterativas de potenciais de ação. Tem provavelmente origem na hipersensibilidade ao potássio nas regiões da membrana em que atua. Resumindo, o modo de ação da peçonha de Ph. nigriventer no canal do sódio é semelhante ao da veratrina e particularmente ao da crotamina e β-escorpionicotoxina. Como estas, ativa certo número de canais do sódio e desvia a voltagem dependência de ativação do sódio ionóforo para potenciais mais negativos. É interessante registrar que seus princípios tóxicos são toxinas polipeptídicas de peso molecular de 5000 a 6000 daltons (SCHENBERG e PEREIRA LIMA, 1966) semelhantes, portanto, à crotamina (peso molecular 4900 daltons, LAURE, 1975) e às escorpionicotoxinas.

A peçonha de Ph. nigriventer por atuar no canal do sódio produz descargas iterativas de potenciais de ação e aumento da liberação de acetilcolina. Este aumento foi comprovado diretamente pela dosagem na liberação do neurotransmissor (liberação espontânea) ou indiretamente pelo aumento na freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura. As contrações espontâneas fásica e tônica observadas no diafragma inervado, não estimulado, após adição da peçonha nas concentrações pequena e média (fig. 2), resulta da liberação do neuro-

transmissor, pois, foram abolidos pela adição de d-tubocurarina ao banho. Em preparações estimuladas indiretamente, ao lado das contrações espontâneas houve aumento da tensão dos "twitches" e retardo em seu relaxamento. Isto decorre de os potenciais de ação tornarem-se iterativos, isto é, a cada estímulo aplicado sobre o nervo origina-se não somente um, mas vários potenciais de ação. As respostas são contrações tetânicas, síncronas e as síncronas das fibras constitutivas do diafragma. A curarização da preparação antagonizou parcialmente tanto o aumento da tensão dos "twitches" como o retardo em seu relaxamento provocado pela peçonha nas concentrações de 1 e 5 ug/ml (tab. III e IV). Esses resultados se assemelham aos obtidos por VITAL BRAZIL et al (1973) e VITAL BRAZIL e FONTANA (1977) quando utilizaram o veneno de Tityus serrulatus em preparações isoladas nervo frênico diafragma não curarizado e curarizado. A curarização da preparação mostra que esses efeitos decorrem principalmente de ação pré-juncional. Na realidade segundo tudo indica são produzidos pela liberação de acetilcolina. Esta ação liberadora explica também a atividade descurarizante parcial do veneno de Ph. nigriventer (fig. 9) registrada igualmente com a peçonha de Tityus serrulatus (VITAL BRAZIL, et al, 1973) e com o veneno de Centruroides (DEL POZO, 1956). O bloqueio neuromuscular produzido pela peçonha de Ph. nigriventer não é devido a uma ação no receptor colinérgico da placa terminal. A peçonha não reduz a amplitude do potencial de placa terminal sendo o seu desaparecimento abrupto. Também não é devido a uma diminuição na liberação do neurotransmissor conseqüente à diminuição de influxo de Ca^{++} durante a despolarização da terminação nervosa, pois a 4-aminopiridina não reverteu o bloqueio, como o faz no bloqueio neuromuscular produzido pelo Mg^{++}, antibióticos aminoglicosídeos (SOBEK et al, 1968), toxina botulínica (LUNDH et al, 1977) e crotoxina (VITAL BRAZIL et al, 1979). O bloqueio muito provavelmente resulta de interferência com o potencial de ação devido à despolarização da membrana próximo às terminações nervosas. Entretanto o Ca^{++} (10mM) antagonizou parcialmente o bloqueio (fig. 6). Provavelmente isto seja devido à propriedade estabilizadora do Ca^{++} em membranas excitáveis, isto é, o calcio atuaria

impedindo a despolarização da membrana das terminações nervosas causa provável do bloqueio.

A peçonha em estudo produziu potenciais de placa terminal iterativos. Resultados semelhantes foram obtidos por KATZ e EDWARDS (1972) quando utilizaram a peçonha de Centruroides sufussus sufussus. Verificaram que um estímulo isolado produz respostas iterativas no nervo e no músculo e que cada trem de potenciais de placa terminal é precedido por um potencial de ação nas terminações nervosas. Sugeriram que o local mais provavel de ação da peçonha é a área do axônio já desprovido dos envoltórios de mielina próxima de sua terminação. Utilizando WARNICK (1976) a tityustoxina também observou potenciais de placa terminal iterativos após 14 minutos da sua adição ao banho. Observou ainda que em alguns casos estes potenciais se somam dando lugar à potenciais de ação.

Em hemidiafragmas cronicamente desnervados, a peçonha de Ph. nigriventer na concentração pequena e média não produziu nenhum efeito. Com a concentração maior (25 ug/ml) as respostas à estimulação elétrica, à acetilcolina e ao ion potássio foram deprimidas. Estes efeitos foram parcialmente antagonizados pelo Ca^{++}. Os resultados demonstram que a ou as neurotoxinas da peçonha não atuam nos receptores colinérgicos, bloqueando-os, pois, o Ca^{++} não antagoniza a inibição causada pela d-tubocurarina e outros antagonistas nas respostas à acetilcolina no hemidiafragma cronicamente desnervado. Na mesma preparação observou-se ainda que o potencial de repouso não se alterou mesmo quando se utilizou a peçonha na concentração maior. Contudo como o potencial de membrana nesta preparação é baixo, pois, sabe-se que em músculos desnervados cronicamente há uma diminuição da permeabilidade ao potássio e conseqüentemente uma diminuição no potencial de repouso (GINSBORG e JENKINSON, 1976), não se pode deduzir que a desnervação tenha condicionado o desaparecimento dos canais do sodio ativáveis pela peçonha.

Em resumo a presente investigação revelou que a peçonha de Phoneutria nigriventer ativa o canal do sódio em membranas excitáveis. Esta ativação explica os efeitos produzidos pela peçonha na preparação nervo frênico-diafragma do

rato. É provável que outros efeitos que se manifestam durante envenenamento tais como dor, fenômenos autonômicos como sialorréia, sudorese, lacrimejamento, priapismo, taquicardia, arritmias, também decorram da ação da peçonha no canal do sódio dando lugar às descargas iterativas de potencial de ação e conseqüente liberação de neurotransmissores. Em doses elevadas, entretanto, a peçonha produz efeitos no diafragma cronicamente desnervado que não podem ser atribuidos à ativação do canal do sódio. A ação do cálcio nestes efeitos sugere a possibilidade de que sejam produzidos por uma diminuição no influxo do íon Ca durante a despolarização da membrana das fibras musculares.

IX - CONCLUSÕES:

1 - A peçonha de Phoneutria nigriventer atua na membrana de fibras nervosas e musculares ativando o canal do sódio.

2 - Provavelmente provoca também um desvio da voltagem dependência de sua ativação para potenciais próximos ou iguais ao potencial de repouso.

3 - Todos os efeitos provocados pela peçonha na preparação nervo-frênico diafragma do rato, podem ser explicados pela ação da peçonha no canal do sódio.

4 - A peçonha em doses muito elevadas, exerce uma outra ação provavelmente pelo envolvimento do influxo de Ca^{++}, revelado apenas na preparação hemidiafragma cronicamente desnervado do rato.

X - R E S U M O

O estudo das ações da peçonha de Phoneutria Nigriventer na junção neuromuscular e músculo esquelético foi efetuado nas preparações nervo frênico diafragma e hemidiafragma cronicamente desnervado de rato. No diafragma estimulado indiretamente os seguintes efeitos foram observados: 1) Aumento da tensão dos "twitches" acompanhado de retardo em seu relaxamento, 2) Contração tonica espontânea (dose dependente), 3) Contrações fasicas espontâneas, principalmente com o uso de 5 ug/ml da peçonha, 4) Bloqueio neuromuscular irreversível com as doses de 5 ug/ml e 25 ug/ml do veneno. As contrações fásicas espontâneas não ocorreram em preparações curarizadas. O bloqueio produzido pela peçonha foi parcialmente antagonizado pelo cálcio, mas não pela neostigma ou 4-aminopiridina. A peçonha de Phoneutria nigriventer reverteu parcialmente o bloqueio causado pela d-tubocurarina. Em preparações não estimuladas a peçonha produziu contração tônica superpostas de contrações fásicas. Estes efeitos foram abolidos pela curarização da preparação. Verificou-se também o efeito da peçonha de Phoneutria nigriventer sobre os potenciais bioelétricos do músculo (potencial de repouso, potencial de placa terminal em miniatura, potencial de placa terminal e potencial de ação). A peçonha causou despolarização nas regiões das terminações nervosas do diafragma bloqueado ou não pela d-tubocurarina ou α-bungarotoxina. Nas outras regiões o efeito foi discreto ou nulo. A despolarização foi antagonizada pela tetrodotoxina ou pela redução externa do teor em sódio, o que mostra ser devido à ativação do canal do sódio. O cálcio reverteu parcialmente a despolarização. Em relação aos potenciais de placa terminal em miniatura observou-se primeiramente um aumento na sua amplitude e a seguir aumento da frequência. Esses efeitos também foram antagonizados pela tetrodotoxina resultando portanto da ativação do canal de sodio. Após adição da peçonha ao banho os potenciais de placa terminal tornaram-se iterativos, sua amplitude não foi afetada e o seu desaparecimento ocorreu abrupta-

mente. O veneno produziu descargas repetitivas espontâneas de potenciais de ação. Em nenhuma experiência a duração dos potenciais de ação foi alterada.

Na preparação hemidiafragma cronicamente desnervada a peçonha nas concentrações de 1 e 5 ug/ml não produziu efeitos. Contudo na de 25 ug/ml causou ligeira contratura e inibiu irreversivelmente as respostas do músculo à estimulação elétrica. A peçonha inibiu também a contratura provocada pela acetilcolina e pelo potássio. O íon cálcio antagonizou totalmente a inibição da contratura causada pela acetilcolina e parcialmente a do potássio. A peçonha na concentração de 25 ug/ml não alterou o potencial de membrana

Os efeitos observados na preparação nervo frênico diafragma de rato explicam-se pela ativação do canal do sodio produzido pela peçonha. Na preparação hemidiafragma cronicamente desnervada, em doses elevadas verificou-se que a peçonha produziu efeitos não decorrentes de ação no canal do sodio. Esses efeitos decorrem possivelmente de uma interferência no influxo do Ca^{++}.

XI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, K. R. & WEISS, C. Some aspects of the pharmacology of the venom of African scorpions. Mem. Inst. Butantan, 23: 603, 1966.

ADAM, K. R., SCHIMDT, R., STAMPFLI, R. & WEISS, C. The effect of scorpion venom on single mielinated nerve fibres of the frog. Brit. J. Pharmacol., 26: 666, 1966.

BARRIO, A. Spastic action of the venom of the spider Phoneutria fera. Acta Physiol. Latinoam, 5: 132, 1955.

BETTINI, S. & CANTORE, G. P. Quadro clínico del latrodectismo Riv. Parassit., 20: 49, 1959.

BETTINI, S. & MAROLI, M. Venoms of theridiidae, Genus latrodectus In: Bettini, S., ed. Arthropod venoms Berlin, Springer, 1978 p. 149.

BRAZIL, V. & VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. Mem. Inst. Butantan, 2: 5, 1925.

BRAZIL, V. & VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas Mem. Inst. Butantan, 3: 243, 1926.

BÜCHERL, W. A "armadeira"; a aranha mais perigosa do mundo! In:--------. Acúleos que matam. São Paulo, Kosmos, 1980 cap. 6, p. 35-45.

BÜCHERL, W. Novo processo de obtenção de veneno seco, puro, de Phoneutria nigriventer (Keyserlingi 1981) e titulação da DL50 em camundongos. Mem. Inst. Butantan, 25: 153, 1953.

BÜCHERL, W. Venomous animal and their venoms. In BÜCHERL,

W & BUCKLEY, E. E., eds. Venomous invertebrates. New York, Academic, 1971 p. 197-277.

BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve; diaphragm preparation of the rat. Brit. J. Pharmacol., 1: 38, 1946.

CAHALAN, M. D. Modification of sodium channel gatting in frog myelinated nerve fibres by Centruroides sculpturatus scorpion venon J. Physiol (London), 244: 511-34. 1975.

CAHALAN, M. D. Molecular properties of sodium channel in excitable membranes In: COTMAN, C. W.; POSTE, G.; NICOLSON, G. L., ed. The cell surface and neuronal function. Amsterdam, North-Holland, 1980

CATTERALL, W. A. Neurotoxins as allosteric modifiers of voltage-sensitive sodium channels. Neurotoxins; tool in neurobiology. New York, Raven, 1979. p. 305.

CLARK, A. W., MAURO, A., LONGENECKER, H. E. & Jr. HURLBUT, W. P. Effects of black window spider venom on the frog neuromuscular Junction. II Effects on the fine struture of the frog neuromuscular junction. Nature, 225: 703-6, 1970.

COURRAUD, F., JOVER, E., DUBOIS,J. M. & ROCHAT, H. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. Toxicon, 20 (1) 9, 1982.

DEL POZO, F. C. Mechanism of pharmacological actions of scorpion venoms. In: BUCKLEY, E. E. & Dorges, N., ed. Venomous Washington, D. C., 1956. p. 123. (American Association for the Advancement of science. Publ. nº 44).

EICKSTEDT, V. R. D. Von. Estudo sistemático de Phoneutria nigriventer (Keyserlingi, 1891) e Phoneutria keyserlingi (Pi-

chard-Cambridge 1897) (Aranae: labidognata; ctenidae). Mem Inst. Butantan, 42/43: 95, 1978/79.

GINSBORG, B. L. & JENKINSON, D. H. Transmission of impulse from nerve to muscle. In: ZAIMIS, E. Neuromuscular junction. Berlin, Springer, 1976 p. 229.

GRAY, M. R. & SUTHERLAND, S. K. Venoms of Diplüridae In: BETTINI, S., ed. Arthropod venoms Berlin, Springer, 1978. p. 144.

HOUSSAY, B. A. & GARIBALDI, F. Nota preliminar acerca de las aranãs "theraphosae" venenosas. Prensa Med. Argent, 3: 53, 1916.

HURLBURT, W. P. & CECCARELLI, B. Use of black widow spider venom to study the release of neurotransmitters. In: CECCARELLI, B. & CLEMENTI, F., ed. Neurotoxins; tools in neurobiology. New York, Raven, 1979, p.87.

KATZ, N. L. & EDWARDS, C. The effect of scorpion venom on the neuromuscular junction of the frog. Toxicon, 10: 133, 1972

KOPPENHÖFER, E. & SCHMIDT, H. Die wirkung von skorpiongift auf die Ionenströme des Ranvierschen Schnürrings. I. Die Permeabilitäten P_{na} und P_k. Pflügers Arch., 303: 133-49, 1968a.

KOPPENHÖFER, E. & SCHIMIDT, H. Die wirkung von skorpiongift auf die Ionentröne des Ranvierschen Schnürrings. II. Unvollständige Natrium-Inaktivierung. Pflügers Arch., 303: 150-61. 1968b.

KRAYER, O & ACHESON, G. H. The pharmacology of the veratrum Alkaloids. Physiol. Rev., 26: 383, 1946.

KUFFLER, S. W. Action of veratrine on nerve-muscle preparation J. Neurophysiol., 8: 113-21, 1945.

LAURE, C. J. Die Primärstruktur des crotamin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 356: 213, 1975

LEVI, H. W. Number of species of black-window spiders (theridiidae: Latrodectus). Science, 127: 1055, 1958.

LEVI, H. W. The spider genus Latrodectus (Aranae, theriddidae) Trans. Amer. Micr. Soc., 78: 7, 1959.

LONGENECKER, H. E.; Jr., HURLBUT, W. P.; MAURO, A. & CLARK, A. W. Effects of black window spider venom on the frog neuromuscular Junction. I. Effects on end plate potential, miniature end plate potential and nerve terminal spike. Nature, 225: 701-3, 1970.

LUNDH, H.; LEANDER, S.; THESLEFF, S. Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat; the effects of tetraethylammonium, guanidine and 4-aminopyridine. J. Neurol. Sci., 32: 29, 1977.

MACHADO, O. Lactrodectus mactans; sua ocorrencia no Brasil. Bol. Inst. Vital Brazil, 5 (4): 153, 1948.

MELLO LEITÃO. Catalogo das aranhas do Rio Grande do Sul. Arq. Museu Nacional, 38: 1943 apud MACHADO, O. Lactrodectus Mactans, sua ocorrência no Brasil. Bol. Inst. Vital Brasil, 5 (4): 153, 1948.

MURAYAMA, K.; ABBOT, N. J.; NARAHASHI, T. & SHAPIRO, B. I. Effects of allethrin and condylactis toxins on the kinetics of sodium conductance of crayfish axons Comp. Gen. Pharmacol., 3: 391-400, 1972.

NARAHASHI, T.; HAAS, H. G.; THERRIEN, E. F. Saxitoxin and tetrodotoxin; comparisons of nerve blocking mechanism. Science, 157: 1441, 1967.

NARAHASHI, T.; MOORE, J.; SHAPIRO, B. I. Condylactis toxin; interaction with nerve membrane ionic conductances Science, 163: 680-1, 1969.

NARAHASHI, T; SHAPIRO, B. I.; DEGUCHI, T.; SCUKA, M & WANG, G. M. Effects os scorpion venom on squid axon membranes. Am. J. Physiol., 222: 850-7, 1972.

NARAHASHI, T.; DEGUCHI, T.; URAKAWA, N. & OHKUBO, Y. Stabilization and rectification of muscle fiber membrane by tetrodotoxin. Am. J. Physiol., 198: 934, 1960.

PATON, W. D. M. & VIZI, E. S. The inhibitory action of nor adrenaline and adrenaline on acetylcholine out put by guinea pig longitudinal muscle strip. Brit. J. Pharmacol., 35: 10, 1969.

PELLEGRINI FILHO, A.; VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D. & LAURE, C. J. The action of cromatine on skeletal muscle; an electro-physiological study. In: ROSENBERG, P., ed. toxins, animal, plant and microbial. Oxford, Pergamon, 1978. p. 375.

SCHENBERG, S. & PEREIRA LIMA, F. A. Pharmacology of the polipeptides from the venom of the spider Phoneutria fera. Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac., 33 (2): 627, 1966.

SCHENONE, H. & SUAREZ, G. Venoms of Scytodidae. In BETTINI, S., ed. Arthopod venoms. Berlin, Springer, 1978. p. 262.

SOBEK, V.; LEMEIGNAN, M; STREICHENBERGER, G.; BENOIST, J. M.; GOGUEL, A. & LECHAT, P. Étude sur le diaphragme isolé de rat de l'antagonisme entre substances curarizants et amino-

pyridines. Arch. int. Pharmacodyn., 171: 356, 1968.

SUTHERLAND, S. K. The Sydney funnel-web spider (Atrax robustus) fractionation of the female venom into five distinct components. Med. J. Aust., 2: 593-6, 1972.

SUTHERLAND, S. K. Venoms of Dipluridae. In: BETTINI, S., ed. Arthropod venoms. Berlin, Springer, 1978. p. 132.

TZENG, M. C. & SIEKEVITZ, P. The effect of the purified major protein factor (- latrotoxin) of black widow spider venom on the release of acetylcholine and norepinephrine from mouse cerebral cortex slices. Brain Res, 139: 190-6, 1978.

VELLARD, J. Le venin des araignées. Paris, Masson, 1936. 312 p.

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

VITAL BRAZIL, O. Comunicação Pessoal, 1981.

VITAL BRAZIL, O. Resultados inéditos.

VITAL BRAZIL, O. & FONTANA, M. D. Unequal distribution of the sodium-channels activated by veratrine and crotamine at the muscle fibre membrane of the rat diafhragm. Toxicon, 20 (1): 80, 1982.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D.; HELUANY, N. F. Effect of 4-aminopyridine on the neuromuscular blockade produced by crotoxin. Toxicon, 17 (Suppl. nº 1): 16, 1979.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D. & PELLEGRINI FILHO, A. Sobre os efeitos produzidos pela peçonha de Tityus serrulatus no músculo esquelético do rato. Ciência e Cultura, 29 (7): 599, 1977.

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

VITAL BRAZIL, O. & PRADO FRANCESCHI, J. The nature of the neuromuscular block produced by neomycin and gentamicin. Arch. int. Pharmacodyn, 8: 249, 1969.

VITAL BRAZIL, O.; PRADO FRANCESCHI, J.; LAURE, C. J. Repetitive muscle response induced by crotamine. Toxicon. 17: 61, 1979.

WARNICK, J. E.; ALBUQUERQUE, E. X.; DINIZ, C. R. Electrophysiological observations on the action of the purified scorpion venom, tityustoxin, on nerve and skeletal muscle on the rat. J. Pharmacol. exp. ther, 198 (1): 155-67, 1976

WARNICK, J. E.; ALBUQUERQUE, E. X.; SANSONE, F. M. Pharmacology of batracotoxin. I. Effects on the contractile mechanism and on neuromuscular transmission of mammalian skeletal muscle. J. Pharmacol. exp. ther., 176: 497, 1971.

WEIL, C. S. Tables for the convenient calculation of median -effective dose (LD_{50} or ED_{50}) and instruction in their use. Biometrics, 8: 240, 1952.