

JÚLIA PRADO •FRANCESCHI

20.12.1970
25/6/93

" ESTUDO SÔBRE CONVULXINA "

Tese de Doutorado apresenta
da ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campi
nas.

Orientador:

Prof. OSWALDO VITAL BRAZIL

Campinas - 1970.

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS
Biblioteca Central

A meu espôso,
meus pais,
minhas filhas.

AGRADECIMENTOS

A Oswaldo Vital Brazil, mestre e pesquisador exemplar, o nosso profundo reconhecimento não só pela orientação segura que imprimiu a este trabalho, mas também pelo carinho e entusiasmo com que despertou em nós a vocação para a farmacologia e dirigiu nossos primeiros passos na carreira científica.

A Nedim Farah Heluany Sobrinho, Maria Aparecida Moraes, técnicos, a Ivone Aparecida Onisto, secretária, o nosso muito obrigada pela eficiência e dedicação com que desempenharam suas funções, excedendo a tudo que nos era lícito esperar.

A Maurício Gomes Lomba, nosso colega e amigo, que tão precocemente nos deixou, agradecemos pelo estímulo constante e sugestões apresentadas.

O nosso reconhecimento se estende ainda a Avelino Rodrigues de Oliveira e Maria Brazil Esteves pela orientação na parte serológica e a gentileza com que colocaram seus laboratórios à nossa

disposição.

A J. J. Sousa Martins, pela valiosa cooperação que nos deu quanto à revisão ortográfica; a Vilma Próide e Lívio Nanni pelos esquemas e fotografias que ilustram este trabalho.

A nossos colegas da Bioquímica, da Genética e da Microbiologia que nos facilitaram o acesso à aparelhagem daqueles Departamentos.

E a todos aqueles, que de uma maneira ou de outra, colaboraram para a realização desta tese.

Este trabalho faz parte do Projeto de Pesquisa intitulado "Separação e estudo farmacológico das toxinas da peçonha da cascavel sul americana", em realização sob os auspícios da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

ÍNDICE

	Páginas
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	4
I. Obtenção, Natureza, Estudo Serológico, Purificação.....	4
II. Determinação das Atividades Coagulante, Hemolítica, Proteolítica e sobre a Permeabilidade Capilar.....	8
III. Toxicidade, Estudo dos Distúrbios Circulatórios e Respiratórios, Efeito no Valor Hematócrito; Altera- ções Eletrocardiográficas.....	10
RESULTADOS.....	16
I. Obtenção, Determinação da Natureza Proteica da Con- vulxina, Estudo Serológico, Purificação.....	16
II. Determinação das Atividades Coagulante, Hemolítica e Proteolítica. Efeitos na Permeabilidade Capilar....	23
III. Toxicidade, Estudo dos Distúrbios Circulatórios e Respiratórios. Efeitos no Valor Hematócrito, Altera- ções Eletrocardiográficas.....	24
DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES.....	42
RESUMO.....	44
REFERÊNCIAS.....	47

INTRODUÇÃO

A peçonha da cascavel sul-americana (Crotalus durissus terrificus) tem sido objeto de inúmeras pesquisas. Entretanto, ainda hoje, mercê de sua complexidade, não são perfeitamente conhecidas a sua composição e a farmacologia de seus componentes.

A primeira toxina separada dessa peçonha foi a crotoxi
na⁴⁰ por Slotta e Fraenkel-Conrat, em 1938. Este componente, considerado puro quando examinado pelos métodos de Cohn⁴⁰, eletrofo⁴⁰rese²⁷, sedimentação e difusão em ultracentrífuga²⁰, foi a primeira toxina de peçonha ofídica obtida sob forma cristalina.

Em 1947, Moura Gonçalves e Polson³⁰ verificaram a existência de componente fortemente básico que, em eletroforese no Tise³⁰lius, era isolado do compartimento superior do ramo descendente. Posteriormente, Moura Gonçalves denominou-o crotamina³².

Em 1955, Neumann e Habermann³⁴ demonstraram que a croto³⁴xina pode ser desdobrada, por cromatografia em coluna de permutador levemente ácido (Amberlite IRC-50 resina carboxílica), em crotactina e fosfolipase; a determinação da toxicidade, em camundongos, mostrou ser a crotactina o principal componente tóxico da peçonha

da cascavel. Habermann, em 1957, refere-se à existência de outra toxina, obtida por eletroforese, por êle denominada Toxina III²¹.

Em 1961, Barrio separou a giroxina⁴, por eletroforese e por cromatografia em Amberlite IRC-50, caracterizando a nova toxina por seus efeitos típicos em camundongos.

A farmacologia da crotoxina foi estudada por O. Vital Brazil et al^{45,46,47,48}, a da crotamina abordada por Barrio e O. Vital Brazil³, Moussatché³³, Moura Gonçalves³², O. Vital Brazil⁴⁴ e Cheymol¹¹.

O estudo farmacológico desses componentes revelou que nenhum deles pode ser responsabilizado pelo aparecimento de "movimentos convulsivos alternados com períodos de torpor e relaxamento ou então convulsões que se repetiam a curto intervalo", observado por Vital Brazil⁵, em cães, após a administração venosa da peçonha. Além disso, nenhuma das toxinas citadas é capaz de reproduzir, na pressão arterial de animais anestesiados, o tríplice efeito (queda imediata, hipertensão breve, hipotensão duradoura) descrito por Arthus¹ e estudado por Vellard e Huidobro⁴² e por O. Vital Brazil⁴³. Também o efeito imediato provocado pela injeção venosa da peçonha sobre a respiração (taquipnéia e apnéia breves e depois longo período de taquipnéia), o qual está relacionado aos fenômenos de estimulação e depressão respiratórias observados por Houssay e Hug²² em ca-beça isolada e perfundida de cão, não é causado quer pela crotoxina⁴⁷, quer pela crotamina⁴⁴, ocorrendo mesmo em experiências com peçonhas desprovidas deste constituinte.

Em 1967, verificou-se⁴⁹ que a fração obtida da peçonha pela precipitação com o grau de saturação de 0,45 em sulfato de amônio, encerrava o fator ou fatores responsáveis pelas perturbações acima descritas. A partir dessa fração, isolou-se toxina desprovida de atividades coagulante, hemolítica e proteolítica, capaz de produzir convulsões em mamíferos, bem como os distúrbios circulatórios e respiratórios precoces já referidos. A esse novo componente denominou-se convulxina.

Do isolamento, identificação, determinação da toxicidade e principais ações farmacológicas da convulxina trata esta tese .

MATERIAL E MÉTODOS

I. OBTENÇÃO, NATUREZA, ESTUDO SEROLÓGICO, PURIFICAÇÃO.

PEÇONHA. Usou-se nesta investigação, um "pool" de 20 gramas de peçonha seca, variedade crotamino negativa, oriundo de serpentário de Catalão, Goiás. Utilizou-se também, em algumas pesquisas serológicas, peçonha de cascavéis da província argentina de Santiago del Estero.

FRACIONAMENTO. Utilizou-se a técnica da precipitação fracionada da peçonha com os graus de saturação em sulfato de amônio empregados por Slotta e Fraenkel-Conrat⁴⁰. Via de regra, dissolvia-se 1 g de peçonha em 90 ml de soro fisiológico, adicionando-se, lentamente, sob agitação contínua, 75 ml de solução saturada de sulfato de amônio. O precipitado separado por centrifugação, era suspenso e dialísado em água destilada até que a reação ao íon sulfato fôsse negativa. Colocava-se, então, a porção insolúvel em água destilada (mas solúvel em soro fisiológico), com massa média de 100 mg, em coluna de Sephadex G-100. Colunas K 15/30 e K 15/90 foram usadas, com fluxo de 15 ml/hora. O gel era equilibrado previamente com tampão fosfato 0,2M, acrescido de cloreto de sódio 0,15M, pH 6, e o precipitado sus

penso no mesmo tampão. Colhiam-se as frações em coletor Reco*, a volume constante, com sifão de 2,5 ml.

Acompanhava-se o conteúdo proteico dos eluatos pela leitura da densidade óptica a 2 800 e 2 600 Å. Com o tampão fosfato obtinha-se primeiro um pico não uniforme, constituído por crotoxina e outro componente ainda não devidamente estudado (deltatoxina⁵⁰). Estabelecendo-se com ácido acético 0,1M, pH 3,5, um gradiente de pH, aparecia um segundo pico, correspondente à convulxina. Um "pool" dos tubos que correspondiam a êsse pico era dialisado, centrifugado e concentrado.

Procedia-se, então, à refiltração da convulxina em tampão acetato 0,1M, pH 4,4 em coluna de Sephadex G-200.

NATUREZA, ** Usou-se a técnica do biureto seguindo-se o método de Weichselbaum⁵²: a 1 ml de solução com 1 mg de convulxina dissolvida em soro fisiológico acrescentava-se 1,5 ml de reagente (tartarato de sódio e potássio 9,0; sulfato de cobre.5H₂O, 3,0 g; iodeto de potássio 5 g; hidróxido de sódio 0,2M q.s.p. 1 000 ml).

* Gentilmente cedido pelo Prof. Charles Edward Corbett do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

** Nossos agradecimentos a D. Celene Oliveira Rangel pela gentileza com que nos auxiliou na realização desta parte.

Incubava-se a mistura a 37°C durante 30 minutos. A leitura era feita em espectrofotômetro Coleman Jr. a $5550\text{ \AA}$.

O método de Folin - Ciocalteu¹³, modificado por Lowry et al.²⁹, foi também utilizado. Empregaram-se as seguintes soluções:

a - tartarato duplo de sódio e potássio (sal de Rochelle) 4%;

b - sulfato de cobre a 2%;

c - carbonato de sódio a 3% em Na OH 0,1N;

d - partes iguais de a e b (0,2 ml) que completaram 10 ml com c;

e - reagente de Folin.

Em tubos de ensaio colocavam-se em 0,25 ml, quantidades diferentes de convulxina ou de padrão (sôro com 1,5 mg de proteína/ml).

Adicionavam-se a cada tubo, 2,5 ml de solução d preparada no momento de uso. Aguardavam-se 10 minutos. Juntavam-se a cada tubo, sob forte agitação, 0,25 ml de reagente de Folin. A leitura era feita em espectrofotômetro Coleman Jr. a $6600\text{ \AA}$.

ESTUDO SEROLÓGICO. Alguns fracionamentos foram acompanhados por imunodifusão, ensaiando-se os eluatos contra sôro anticrotálico, preparado pelo Instituto Butantan. Seguiu-se, neste ensaio, o método clássico de Ouchterlony³⁷, modificado por A. R. de Oliveira³⁶: lâminas de vidro de 75x25 mm eram recobertas com 3 ml de ágar em sôro fisiológico tamponado com fosfato 0,2M, pH 7, acrescido de mertiol-

to 1:10 000 ou Cialit^{*} a 0,25%. Os orifícios de 4 mm de diâmetro distavam 7 mm uns dos outros.

A convulxina foi ensaiada também contra os soros: anticrotálico preparado pelo Instituto Malbrán^{**}, antibotrópico do Instituto Butantan e anticrotoxínico puro preparado no Departamento de Farmacologia da Universidade Estadual de Campinas.

Nas experiências de imunoeletroforese^{***}, baseadas nos trabalhos de Grabar e Williams¹⁹, utilizaram-se lâminas preparadas de modo já descrito, tampão fosfato de 0,2 a 1,0M, pH 7 a 8 nos reservatórios, voltagem de 20 a 40 V e ampereagem de 10 a 20 mA. O tempo de migração durou 1 a 2 horas. Nestes experimentos utilizou-se apenas o soro anticrotálico do Instituto Butantan contra peçonha, crotoxina e convulxina. As lâminas foram coradas pelo negro de amido.

Verificou, ainda, o poder de neutralização do soro anticrotálico preparado pelo Instituto Butantan frente à convulxina e à crotoxina, com o uso de método semelhante ao de Vital Brazil⁷: incubavam-se, durante 10 minutos, misturas de 0,1 ml de soro anticrotálico

* Cialit - sal sódico do ácido 5-carboxi 2-etil mercuro mercapto-bensoxazol.

** Gentilmente enviado pelo Dr. Avelino Barrio.

*** Realizada na Seção de Virologia do Instituto Agronômico sob orientação do Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira.

co com doses crescentes de toxina em 0,4 ml de sôro fisiológico. Injetavam-se, então, as misturas por via venosa, em camundongos e determinavam-se as DE 50 e DL 50 pelo método que será descrito em TOXICIDADE.

PURIFICAÇÃO. Usaram-se camundongos de 17 a 21 g nos quais se determinaram as DE 50 da peçonha, da fração I e da convulxina, da forma que será descrita em TOXICIDADE. A quantidade de convulxina necessária para produzir apnéia de curta duração em cinquenta por cento dos animais injetados, foi tomada como unidade específica convulxina.

II. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES COAGULANTE, HEMOLÍTICA, PROTEOLÍTICA E SOBRE A PERMEABILIDADE CAPILAR.

ATIVIDADE COAGULANTE. A atividade coagulante da convulxina foi verificada em plasma de coelho e de cão. Usou-se método semelhante ao de Vital Brazil e Vellard⁹: a 1 ml de plasma fluoretado a 3 por mil adicionavam-se quantidades crescentes de peçonha ou de convulxina, completando-se o volume da mistura, com sôro fisiológico, para 2 ml. As misturas eram incubadas a 37°C durante uma hora, anotando-se a concentração em que se iniciava a coagulação ao fim desse tempo.

ATIVIDADE HEMOLÍTICA. A atividade hemolítica (direta e indireta) foi pesquisada utilizando-se hemácias e sôro de cão, segundo técnica de Cesari e Boquet¹⁰ modificada: em tubos de hemólise colocavam-se

0,5 ml de sôro inativado a 56°C durante uma hora, 0,5 ml de sôro fisiológico com quantidades conhecidas de peçonha ou de convulxina, e 0,5 ml de solução de hemácias padronizadas (segundo Rangel³⁹) a 1:30. Completava-se o volume da mistura para 5 ml utilizando-se sôro fisiológico.

A atividade direta era estimada em tubos onde se suprimia o sôro inativado. Obtinha-se o tubo-testemunha, substituindo-se a peçonha por sôro fisiológico.

As misturas, após uma hora de incubação a 37°C, eram centrifugadas e o sobrenadante submetido a leitura no espectrofotômetro Coleman Junior a 5 500 Å.

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA. Para a determinação da atividade proteolítica da peçonha e da convulxina, usou-se a modificação do método de Kunitz²⁶, descrita por Ohsaka³⁵.

Em tubos de 5 ml misturavam-se:

1,0 ml de solução de peçonha ou convulxina a 0,1%;

0,5 ml de tampão fosfato a 0,2M, pH 7,5;

0,5 ml de solução 4% de caseína em solução de fosfato dissódico a 0,1M.

Incubavam-se as misturas a 37°C durante 15, 30, 60 e 120 minutos. A reação era interrompida com 2 ml de ácido tricloroacético 1M. Excluía-se o excesso de caseína por centrifugação.

A digestão era avaliada medindo-se a absorção do sobrenadante a 2 800 Å em espectrofotômetro Beckmann DB.

Usando-se o mesmo método fixou-se, em algumas experiências, o tempo de digestão em 30 minutos e variaram-se as concentrações da peçonha e da convulxina. A peçonha botrópica, também ensaiada, demonstrou a eficácia do método.

ATIVIDADE SOBRE A PERMEABILIDADE CAPILAR. A alteração da permeabilidade capilar foi pesquisada em coelhos anestesiados pelo pentobarbital sódico (40 mg/kg i.v.) nos quais se injetavam por via venosa 2 ml/kg de solução azul de Evans a 0,5% e, logo a seguir, por via intradérmica, no ventre depilado, doses crescentes de histamina, convulxina, peçonha e soro fisiológico, seguindo-se esquema previamente determinado. O volume injetado era para todas as substâncias de 0,2 ml.

Após 15 minutos, a pele era retirada e montada para fotografia e mediam-se os diâmetros das manchas.

III. TOXICIDADE, ESTUDO DOS DISTÚRBIOS CIRCULATÓRIOS E RESPIRATÓRIOS, EFEITO NO VALOR HEMATÓCRITO; ALTERAÇÕES ELETROCARDIOGRÁFICAS.

TOXICIDADE. As determinações da DL 50 da convulxina bem como de sua DE 50 (efeitos considerados: apnéia e/ou convulsões) foram realizadas em camundongos de 17 a 21 g e em gatos de 700 a 1 360 gramas. Usou-se a via venosa.

As doses de convulxina, contidas em volumes de 0,5 (camundongos) ou 1 ml (gatos) estavam entre si em progressão geométrica de razão igual a 1,5. Os efeitos eram observados desde o mo-

mento da injeção até a recuperação dos animais (30 minutos). Para determinação do efeito letal as experiências prolongavam-se por 24 horas.

Calcularam-se as doses letais medianas, as doses efetivas medianas e respectivos intervalos fiduciais a nível de 95% pelo processo de Weil⁵³.

Verificou-se, ainda, a toxicidade para cães e coelhos por administração venosa, assim como para cobaias e camundongos por administração intraperitoneal.

EFEITOS NA PRESSÃO ARTERIAL, NA RESPIRAÇÃO E NO VALOR HEMATÓCRITO.

Usaram-se cerca de 60 cães, de ambos os sexos, de 5 a 10 kg, anestesiados pelo pentobarbital sódico (30 mg/kg i.v.).

A pressão arterial era tomada na artéria carótida e registrada pelo processo habitual com manômetro Ludwig. Introduzia-se na traquéia cânula de dupla abertura; uma de suas saídas era conectada por meio de tubo curto de borracha a tambor de Marey para registro no quimógrafo dos movimentos expiratórios e inspiratórios do animal. A outra saída, habitualmente mantida livre em contato com o ar, era, em alguns casos de prolongada apnéia, ligada a respirador Takaoka para garantir a sobrevivência do animal.

A veia femoral foi sistematicamente canulada para a introdução venosa de convulsina. Em algumas experiências a artéria femoral também foi preparada para retirada de sangue que serviu para a determinação dos valores hematócritos. As amostras de sangue, heparinizadas, eram colocadas em tubos de hematócrito Wintrobe, de

1 ml de capacidade e submetidas a 1 600 r.p.m. durante 30 minutos.

ESTUDO DAS CAUSAS DAS PERTURBAÇÕES RESPIRATÓRIAS.

Secção dos nervos vagos. Injetou-se a convulxina em cinco cães nos quais ambos os nervos vagos tinham sido seccionados em sua porção cervical. Os animais achavam-se anestesiados pelo pentobarbital sódico (30 mg/kg) e preparados para registro da pressão arterial e dos movimentos respiratórios.

Registro dos potenciais do nervo frênico. Usaram-se seis cães preparados para registro da pressão arterial, curarizados pelo triiodotilato de galamina (Flaxedil) na dose de 4 mg/kg e mantidos sob respiração artificial. O quinto ramo cervical do nervo frênico era dividido e a porção proximal colocada em eletrodo bipolar de platina, ligado a um pré-amplificador. A pele, em torno do local era retraída a fim de reter um poço protetor de óleo mineral.

A atividade bioelétrica do nervo frênico, captada pelo eletrodo era revelada em osciloscópio Tektronix tipo 502-A. Fotografavam-se as descargas bioelétricas com câmera Tektronix tipo C-2 antes da injeção de convulxina e após ela, de maneira contínua.

Desnervação dos glomos carotídeos. Utilizou-se a técnica descrita por Gautrelet¹⁷. Três cães anestesiados e preparados para registro dos movimentos respiratórios e pressão arterial femoral, tiveram os seios carotídeos expostos. Após secção dos nervos de Hering, toda a região de bifurcação da carótida era pincelada com ácido fênico. Verificada a desnervação pela ausência de efeito hipertensor conseguinte à compressão das carótidas, injetava-se a convulxina.

ESTUDO DAS CAUSAS DAS PERTURBAÇÕES CIRCULATÓRIAS.

Destruição do sistema nervoso. A destruição do sistema nervoso central foi realizada pelo método de Galvão e Pereira¹⁶.

Em cães anestesiados previamente com pentobarbital sódico (30 mg/kg) e preparados para registro da pressão arterial da maneira já descrita, a destruição era conseguida pela introdução, na cisterna magna, de solução de cloreto de sódio 20% sob pressão de 60 cm Hg durante 6 minutos.

Imediatamente após a destruição instalava-se a respiração artificial. Para verificação de que o sistema nervoso central achava-se destruído utilizava-se a prova de asfixia. Administravam-se 50 ml de soro fisiológico, de 30 em 30 minutos, após a destruição do sistema nervoso central. Usaram-se 5 animais, jovens e vigorosos.

Bloqueio ganglionar. A ganglioplegia foi realizada pela injeção venosa de brometo de hexametônio na dose de 2 mg/kg. Cães anestesiados pelo pentobarbital sódico e preparados para registro da pressão arterial carotídea, pelo processo descrito, eram atropinizados (2 mg/kg de sulfato de atropina). Verificava-se a existência de bloqueio, injetando-se acetilcolina (5 mg) antes de e após o agente bloqueador.

Verificada a abolição do efeito hipertensor da acetilcolina no animal atropinizado, injetava-se a convulxina. Utilizaram-se 3 cães nestas experiências.

Bloqueio dos receptores α -adrenérgicos. Utilizou-se o sal sódico

do ácido orto-carboxibenzeno-selenínico²⁸, na dose de 10 mg/kg em cães anestesiados pelo pentobarbital sódico e preparados para registro da pressão arterial carotídea pelo processo já descrito. Para verificação do bloqueio dos α -receptores injetavam-se adrenalina e nor-adrenalina (5 μ g/kg) antes de e após o composto selenínico.

Verificada a ausência do efeito hipertensor da nor-adrenalina bem como a inversão do efeito da adrenalina, injetava-se a convulxina. Realizaram-se 3 experiências.

Medidas simultâneas das pressões arteriais central e periférica: técnica dos três manômetros. Seguindo-se o método de Nolf, descrito por Gautrelet¹⁷, foram feitas experiências em 5 cães de 12 a 15 quilos. Os animais eram preparados para registro simultâneo da pressão arterial tomada na carótida e em ambas as artérias femorais. Dissecava-se a artéria femoral do lado direito a partir de sua emergência da arcada crural, numa extensão de 8 cm e ligava-se esta artéria em sua porção média. Acima da ligadura, colocava-se cânula em direção ao coração que servia para a introdução da convulxina e outras drogas. Abaixo da ligadura era introduzida cânula de François-Franck em direção à extremidade da pata. Na femoral esquerda introduzia-se cânula de François-Franck também em direção à pata e na carótida em direção ao coração. Cada cânula era ligada a um manômetro de Ludwig.

Colocavam-se os três manômetros sobre a mesma geratriz do quimógrafo. Entre o preparo do cão e o início da experiência, aguardava-se uma hora para permitir o estabelecimento de circulação cola-

teral em ambos os membros inferiores. A convulxina era, então, injetada na artéria femoral direita.

Alterações eletrocardiográficas. Usaram-se 12 cães anestesiados pelo pentobarbital e preparados para registro da pressão arterial carotídea de modo já descrito.

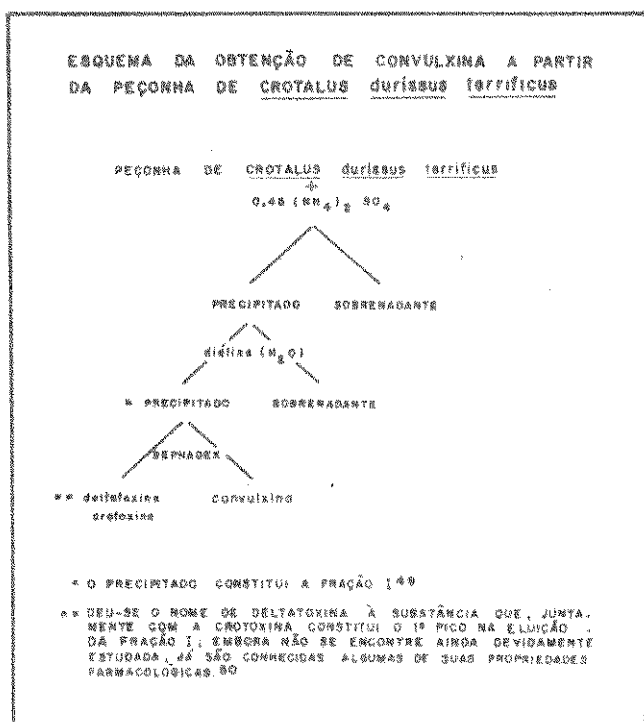
Utilizou-se eletrocardiógrafo (Cardi-O-Mite) de inscrição direta, calibrado com a velocidade de 25 mm/seg. Usou-se a segunda derivação. O registro eletrocardiográfico era feito antes da injeção de convulxina e depois, continuamente, até estabilização da pressão arterial. Três cães tiveram ambos os nervos vagos seccionados antes da injeção de convulxina.

RESULTADOS

I. OBTENÇÃO, DETERMINAÇÃO DA NATUREZA PROTEICA DA CONVULXINA, ESTUDO SEROLÓGICO, PURIFICAÇÃO.

FRACIONAMENTO. As principais etapas do processo de obtenção da convulxina, acham-se representadas na fig. 1

FIGURA 1

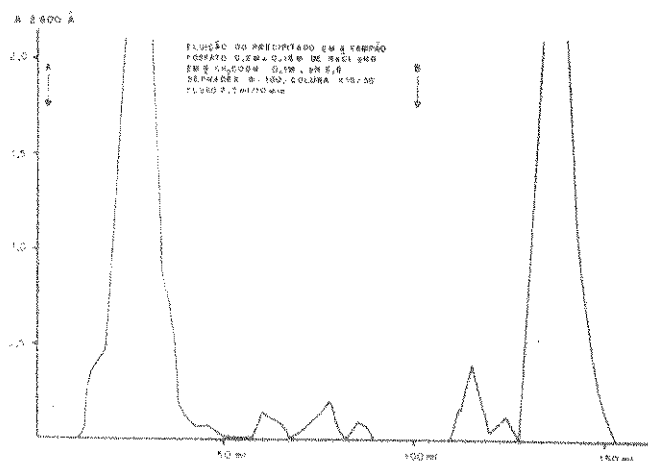


O traçado do fig. 2 ilustra o resultado da filtração em

Sephadex G-100 de 100 mg do precipitado obtido com o grau de satura-

ção de 0,45 em sulfato de amônio, já dialisado. Este traçado é definido pela medida da densidade óptica em $2800 \text{ \AA}$ de cada fração de filtrado recolhida. Pode-se notar a presença de dois picos: o primeiro, constituído pela mistura de deltatoxina e crotoxina, eluída com tampão fosfato 0,2M e cloreto de sódio 0,15M, pH 6 e o segundo, por convulxina eluída com ácido acético 0,1M, pH 3,5

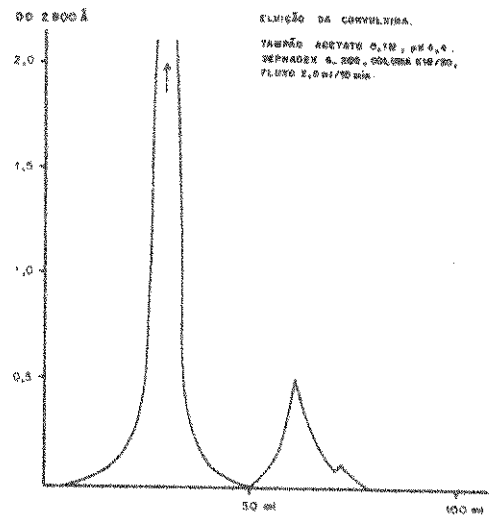
FIGURA 2



O traçado da figura 3 corresponde à filtração de 35 mg de convulxina em Sephadex G-200, em tampão acetato 0,1M, pH 4,4; o

produto final, definido pelo primeiro pico, é homogêneo.

FIGURA 3



NATUREZA. A convulxina reagiu positivamente ao método do biureto. Soluções com 1 mg de convulxina em 1 ml de soro fisiológico deram leituras correspondentes a 0,9 e 0,95 miligramas de proteína por ml. Pelo método de Lowry as mesmas soluções, convenientemente diluídas, revelaram a presença de um miligrama de substância proteica por ml.

ESTUDO SEROLÓGICO.

Reações de precipitação em gel de ágar. As reações de precipitação

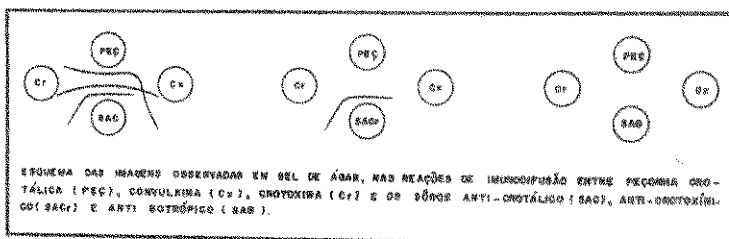


FIGURA 4

entre convulxina e peçonha, crotoxina e os soros ensaiados apresentaram os resultados esquematizados na fig. 4

Observa-se que em A existe completa fusão entre uma das linhas de precipitação da peçonha e da convulxina, sugerindo a presença de somente um fator antigênico na convulxina, dentre os existentes na peçonha. A peçonha de cascavéis de Santiago del Estero * não apresenta a linha de precipitação da convulxina.

Em B e C verifica-se a não existência na convulxina de antígeno capaz de reagir com os anticorpos nos soros anticrotoxínico e antibotrópico.

Reações de precipitação em gel de ágar após absorção seletiva. Nas experiências de absorção seletiva usou-se soro anticrotático previamente absorvido pela convulxina ou pela crotoxina. A fig. 5 mostra a absorção seletiva da linha da convulxina, a fig. 6, a da crotoxina.

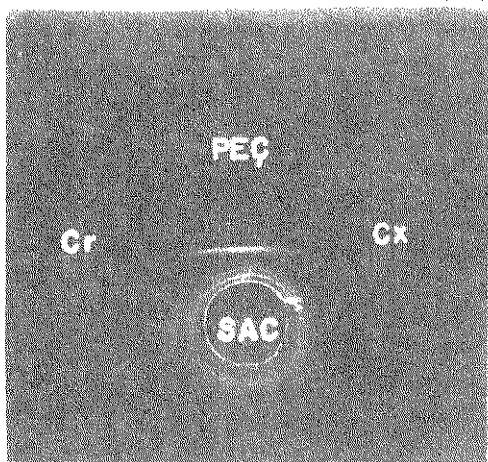


FIGURA 5

Absorção seletiva da linha de precipitação da convulxina.

Temp. 4°C, ágar 1,75%

**
PBS 0,2M, pH 7,0

A Cx precedeu de 24 h o SAC.

* Esta peçonha é incapaz de reproduzir, na pressão arterial, o triplice efeito (O. Vital Brazil⁴³).

** PBS - tampão fosfato acrescido de cloreto de sódio.

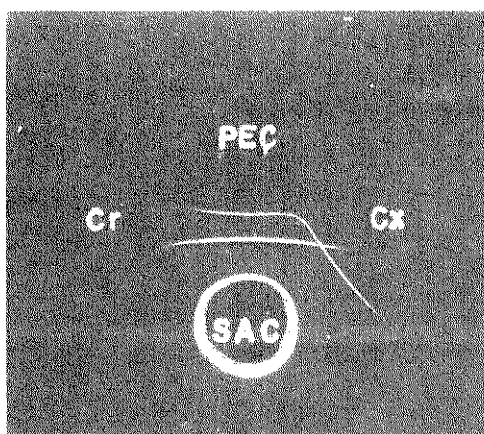


FIGURA 6

Absorção seletiva da linha de precipitação da crotoxina

Temp. 4°C, ágar 1,75%

PBS 0,2M, pH 7,0

A Cr. precedeu de 24h o SAC.

Comportamento imunoeletroforético. À imunoeletroforese, a convulsi_{na} apresentou apenas um único componente com mobilidade eletroforéti

FIGURA 7

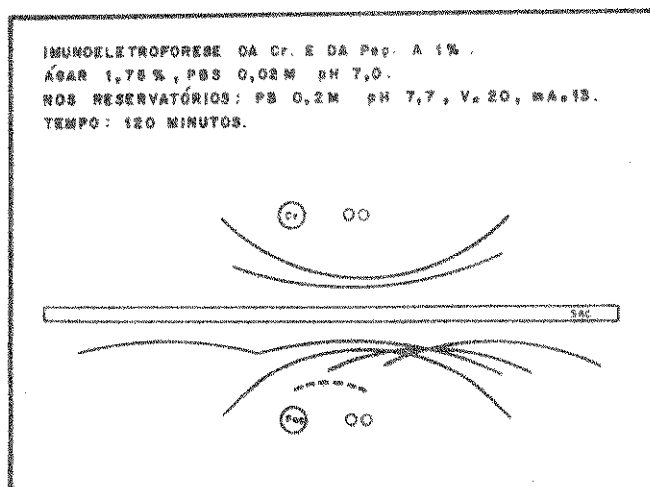
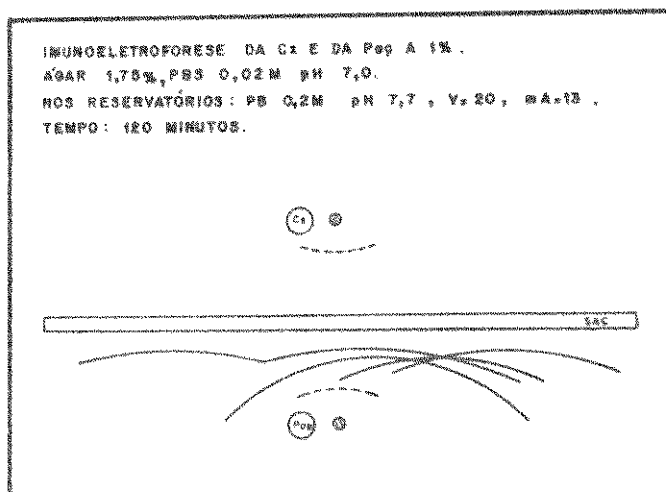
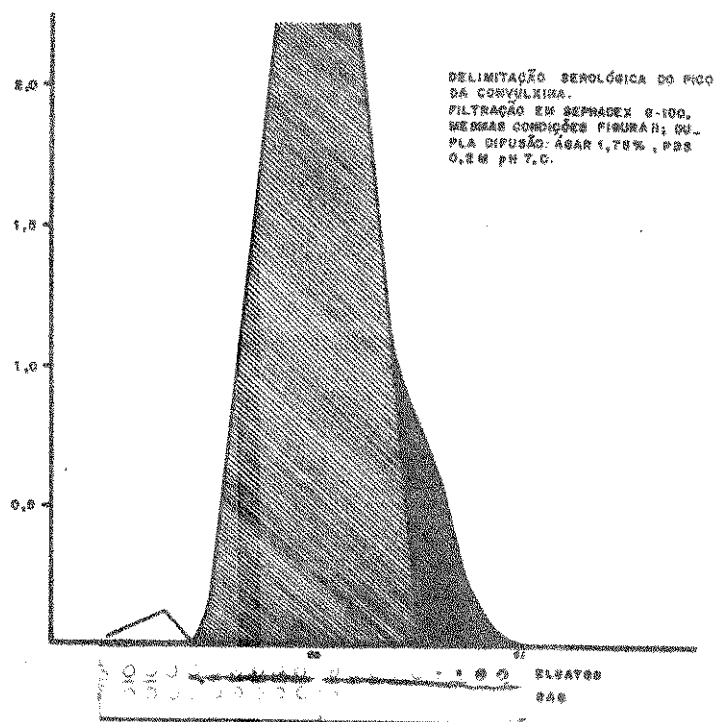


FIGURA 8

ca reduzida, (fig. 7) enquanto na peçonha eram evidenciados seis (figs. 7 e 8) e na crotoxina, dois (fig. 8).

Delimitação serológica do pico da convulxina, por reação da precipitação em gel de ágar. Acompanhou-se a eluição do pico da convulxina, obtido em Sephadex G-100, contaminado ainda pela crotoxina, ensaiando-se cada uma das frações eluídas contra soro anticrotálico. Os resultados obtidos, que podem ser vistos na fig. 9, mostram que a porção central do pico é homogênea, fato confirmado quando da refiltração em Sephadex G-200: a porção terminal contaminada pela crotoxina foi completamente separada por este procedimento (fig. 3).

FIGURA 9



Neutralização da convulxina pelo soro anticrotálico, in vivo. Determinou-se a dose mediana efetiva (efeito considerado: apnéia de curta duração) em camundongos, incubando-se previamente a convulxina com soro anticrotálico. Paralelamente, realizaram-se ensaios com o mesmo soro e crotoxina, pesquisando-se neste caso, a dose de

soro necessária para neutralizar a dose mediana letal. Os resultados apresentados na tabela I indicam, para o soro utilizado, um poder de neutralização de 13 DE 50 de convulxina e de 10 DL 50 de crotoxina.

DETERMINAÇÃO DAS DE 50 (EFEITO CONSIDERADO: APNÉIA DE CURTA DURAÇÃO) E DL 50 E SEUS LIMITES FIDUCIAIS A NÍVEL DE 95% PARA CONVULXINA E CROTOXINA INCUBADAS COM SORO ANTI-CROTÁLICO. CAMUNDONGOS DE 17 ± 21g, VIA VENOZA.

TABELA I

	DE 50	DL 50
	mg/kg e limites fiduciais	e nível de 95%
CONVULXINA	183,7 (144,8 a 233,8)	-
CONVULXINA INCUBADA COM SORO	2 870 (1 886 a 3 290)	-
CROTOXINA	-	82 (67 a 101)
CROTOXINA INCUBADA COM SORO	-	947 (697 a 1 288)
PODER DE NEUTRALIZAÇÃO	13 (6,2 a 26,1)	10 (5,8 a 18,2)

PURIFICAÇÃO. A quantidade de convulxina necessária para produzir apnéia de curta duração em 50% dos camundongos injetados (DE 50),

PURIFICAÇÃO DA CONVULXINA A PARTIR DA PEÇONHA DE
CROTALUS durissus terrificus

SUBSTÂNCIA	MASSA (mg)	TOTAL DE UNIDADES	ATIVIDADE ESPECÍFICA unidade/mg	PURIFICAÇÃO
PEÇONHA	1 000	1 030	1,05	1
FRAÇÃO I	100	270	2,7	2,5
CONVULXINA	30	186	6,2	5,3

TABELA II

tomada como unidade específica, mostrou um fator de purificação de 5,3 para a convulxina (tab. II).

II. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES COAGULANTE, HEMOLÍTICA E PROTEOLÍTICA. EFEITOS NA PERMEABILIDADE CAPILAR.

ATIVIDADE COAGULANTE. A convulxina mostrou-se incapaz de coagular o plasma fluoretado de coelho e de cão (maior dose ensaiada 200 μg). Nas mesmas condições, verificou-se, em geral, início de coagulação com 2 μg de peçonha.

ATIVIDADE HEMOLÍTICA. Nos ensaios realizados verificou-se que a dose de peçonha necessária para hemolisar 50% era da ordem de 2 μg ; a convulxina em doses de 2 a 200 μg não apresentou este efeito.

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA. Utilizando-se caseína como substrato não

FIGURA 10

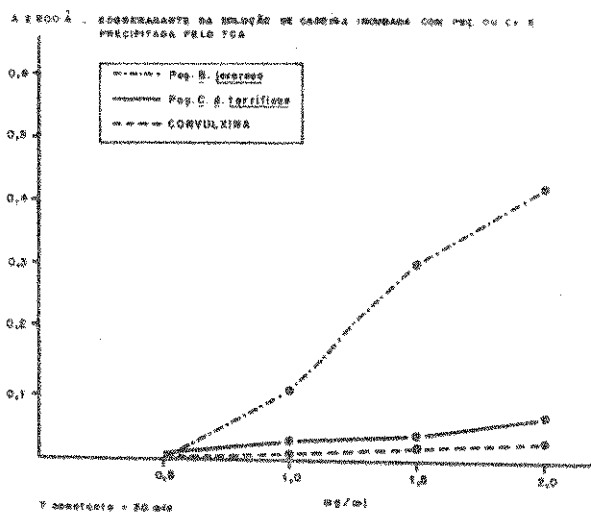
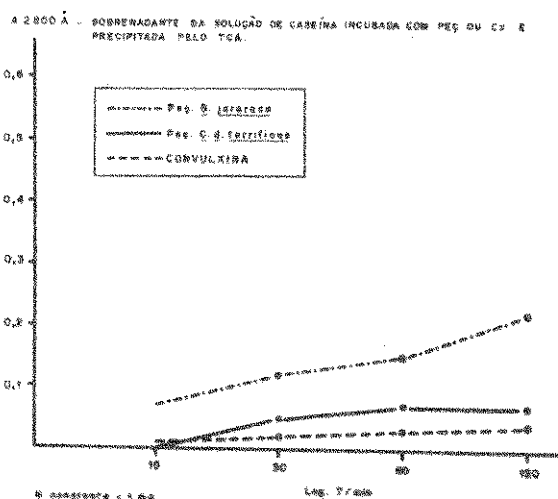


FIGURA 11

foi detectada atividade proteolítica quer na convulxina quer na peçonha crotálica, apesar do tempo prolongado (2 horas) ou das elevadas doses usadas (figs. 10 e 11).

EFEITOS NA PERMEABILIDADE CAPILAR. A convulxina mostrou-se incapaz de alterar a permeabilidade capilar em coelhos e cães, quando injetada em doses semelhantes às da peçonha. As manchas determinadas pela peçonha eram comparáveis às da histamina quando as doses desta eram cem vezes menores (fig. 12).

ESQUEMA

Peg	Cx	Hist
125	125	1,25
250	250	2,50
500	500	5,00

doses em μg

FIGURA 12



III. TOXICIDADE, ESTUDO DOS DISTÚRBIOS CIRCULATÓRIOS E RESPIRATÓRIOS,
EFEITOS NO VALOR HEMATÓCRITO, ALTERAÇÕES ELETROCARDIOGRÁFICAS.

TOXICIDADE. A determinação da dose mediana letal da convulxina, por via venosa, em camundongos, revelou ser este componente menos tóxico para esta espécie animal do que a peçonha total (tab. III). Os sintomas apresentados variaram em função de doses: animais injetados com doses pequenas (5 μg) apresentavam dentro de 20 segundos taquipnéia seguida de apnéia de curta duração. Doses maiores (em torno de 10 μg)

TOXICIDADE DA CONVULXINA PARA CAMUNDONGOS, TOXICIDADE DA FRAÇÃO I E DA PEÇONHA DE C. d. ~~terreflusa~~ ANIMAIS DE 17 e 21 g., VIA VENOSA.

TABELA III

SUBSTÂNCIAS	DOSES MEDIANAS E SEUS LIMITES FIDUCIAIS A NÍVEL DE 50% (em mg/kg)		
	DL 50	DE 50 (EFEITO CONSIDERADO: CONVULSÕES)	DE 50 (EFEITO CONSIDERADO: APNÉIA DE CURTA DURAÇÃO)
CONVULXINA	524 (476 e 605)	322 (495 e 608)	180 (140 e 231)
FRAÇÃO I	2.000 (985 e 4.000) *	1.420 (1.600 e 1.880) *	388 (295 e 580) *
PEÇ. DE C. d. terreflusa	168,8 (108,7 e 209,8)	—	945 (788 e 1.132,8) *
* ANIMAIS PROTEGIDOS COM SORO ANTI-GROTOXINIOS			

provocavam crises intensas que terminavam, regra geral, com a morte do animal. Com o uso da via intraperitoneal não se observaram efeitos com doses de até 10 000 μ g/kg.

A determinação da dose mediana efetiva em gatos revelou ser esta espécie animal bastante sensível à convulxina (DE 50 83,3 (35,6 a 135) μ g/kg). Imediatamente após a injeção venosa os animais apresentaram os seguintes efeitos (tab. IV): perturbações respiratórias (desde taquipnéia até dispnéia intensa), miose, sialorréia,

ALGUNS EFEITOS DA CONVULXINA EM GATOS

EFEITOS	DOSES DE CONVULXINA (mg/kg)			
	83,3	100	120	144
PERTURBAÇÕES RESPIRATÓRIAS	1/4	4/4	4/4	4/4
MIOSE	1/4	3/4	4/4	3/4
SALIVAÇÃO	1/4	1/4	4/4	3/4
CONTRAÇÕES ABDOMINAIS	2/4	3/4	4/4	4/4
RISTASMO	2/4	1/4	3/4	3/4
PERDA DE EQUILÍBRIO	1/4	2/4	3/4	4/4
CONVULSÕES	1/4	2/4	4/4	4/4
FASE BREVE DE HIPOTONIA	0/4	0/4	1/4	3/4
MORTE	0/4	1/4	0/4	1/4

NUMERADOR: INDICA O Nº DE ANIMAIS QUE APRESENTARAM SINTOMAS.
DENOMINADOR: O Nº DE ANIMAIS INJETADOS.

TABELA IV

contrações abdominais, nistagmo, perda de equilíbrio, convulsões, fase breve de hipotonia (mais freqüente com doses maiores) e, e, alguns casos, morte. A grande maioria dos animais recuperou-se dentro de 30 minutos.

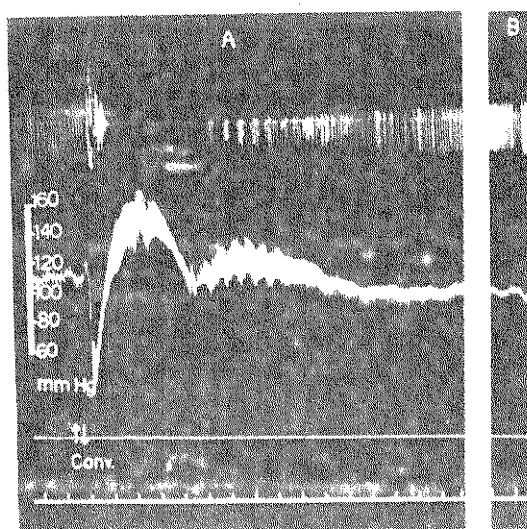
Em cães a convulxina produziu efeitos precoces e tardios. Logo após a injeção venosa (100 a 125 $\mu\text{g/kg}$) observou-se excitação traduzida por latidos, perda de equilíbrio, perturbações respiratórias, nistagmo, emissão de urina, defecação, vômitos. Após recuperação aparente dos animais surgiram (2 animais em 5 injetados) convulsões clônicas que se manifestaram após latência de vinte e quatro horas, de modo intermitente até o sacrifício dos animais. Os outros cães apresentaram períodos de grande agitação alternados com profundo torpor.

Ensaaiaram-se doses de 1 000 a 2 000 $\mu\text{g/kg}$ por via intraperitoneal em cobaias. Nesta espécie animal, e por essa via, os tremores e movimentos convulsivos (após aproximadamente 1 hora) precederam a apnéia que foi tardia (4-10 horas) e levou os animais à morte. A apnéia foi precedida por intensa dispnéia; nesse momento os animais apresentavam tono muscular.

EFEITOS NA PRESSÃO ARTERIAL, NA RESPIRAÇÃO E NO VALOR HEMATÓCRITO. Em cães anestesiados pelo pentobarbital sódico 30 mg/kg i.v. a injeção venosa de convulxina (fig. 13), bem como a de peçonha, produz dentro de 10 segundos queda abrupta e fugaz de pressão arterial, seguida de efeito pressor de curta duração (duplo efeito). A hipotensão secundária, muito acentuada após a injeção venosa de peçonha, acha-se au-

sente ou é, em geral, discreta. Quanto à respiração observou-se em todos os cães injetados, um aumento imediato e fugaz da frequência e amplitude respiratórias, aumento êsse seguido por fase de apnéia nunca inferior a meio minuto (fig. 13). Em três cães, a apnéia persistiu causando a morte dos animais; a outro cão, a respiração artificial foi instituída durante 24 minutos.

FIGURA 13



CÃO, Q. 4,6 kg.
ANESTESIA: PENTOBARBITAL 30 mg/kg, i.v.
REGISTRO DAS ALTERAÇÕES DE PRESSÃO ARTERIAL E DOS MOVIMENTOS RESPIRATÓRIOS. DETERMINAÇÃO DO VALOR HEMATOCRITO
A - Ca 250 mg/kg.
B - 30 min. após A. RETIRADA DE SANGUE
VALOR HEMATOCRITO: ANTES DA CA 42 %.
30 min. após CA 44 %.
TEMPO: 30/30 seg.

Calcularam-se, percentualmente, os máximos de queda de pressão arterial (hipotensão secundária) e aumentos de valor hematócrito causados pela convulsina e pela peçonha. Os resultados de 18 experiências constam da tabela V. Ao contrário da peçonha, a convulsina não produz alterações no valor hematócrito. A pressão arte

rial, após modificações imediatas, volta aos valores iniciais. A diferença das médias encontradas é significativa a nível de probabilidade de 0,01 ($P < 0,01$).

MÁXIMO DE QUEDA DE PRESSÃO ARTERIAL E AUMENTO NO VALOR HEMATÓCRITO CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAVEIOSA DE 250 mg/kg DE CONVULSINA E DE PEÇONHA CROTÁLICA.

Nº	MÁXIMO DE QUEDA DE P.A. %		AUMENTO DO VALOR HEMATÓCRITO %	
	PEÇONHA	CONVULSINA	PEÇONHA	CONVULSINA
1	32,7	0,0	44,7	24,2
2	71,7	9,5	80,0	9,0
3	70,0	13,4	44,2	0,0
4	73,5	2,5	21,5	7,5
5	50,7	14,0	36,1	9,0
6	60,2	18,1	56,4	0,0
7	68,7	2,5	71,7	14,5
8	35,3	18,4	54,3	11,3
9	-	14,0	-	16,4
10	-	7,4	-	4,5
MÉDIA ± e.p.	58,3 ± 8,8	9,8 ± 3,0	52,5 ± 9,8	6,7 ± 3,3

TABELA V

ESTUDO DAS CAUSAS DAS PERTURBAÇÕES RESPIRATÓRIAS.

Secção dos nervos vagos. Em cães anestesiados, a secção dos nervos

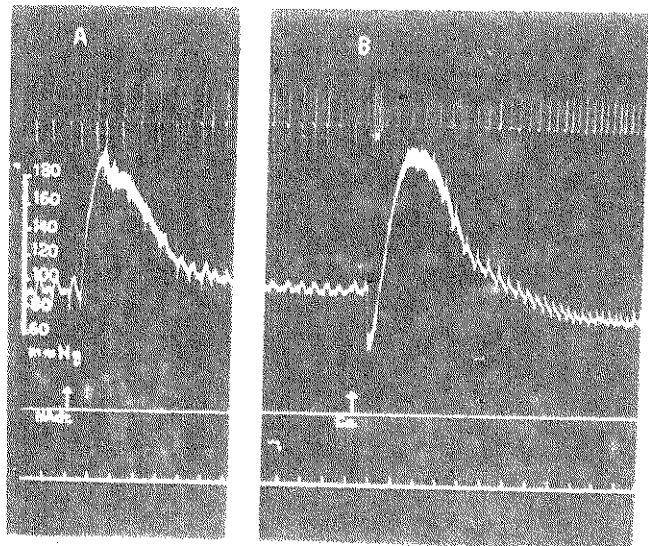


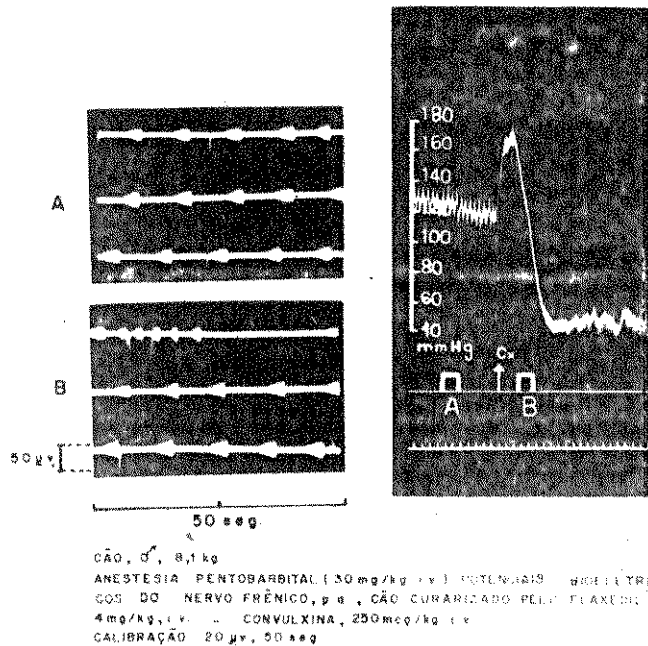
FIGURA 14

CÃO, ♂, 7,5 kg
ANESTESIA PENTOBARBITAL, 30 mg/kg
NERVOS VAGOS SECCIONADOS
A. NAcr 100 mg...
B. Cr 250 mg/kg...
TEMPO, 50/50 seg

vagos aboliu a apnéia produzida pela administração venosa da convulxina. A fase de hiperpnéia permaneceu inalterada (fig. 14,8)

Registro dos potenciais do nervo frênico. O registro dos potenciais bioelétricos do nervo frênico em cães curarizados revelou, imediatamente após a injeção de convulxina, um aumento na frequência das descargas, na fase correspondente à hiperpnéia observada em outros animais. Seguiu-se a essa fase um período de apnéia, traduzido por silêncio elétrico com duração variável (fig. 15).

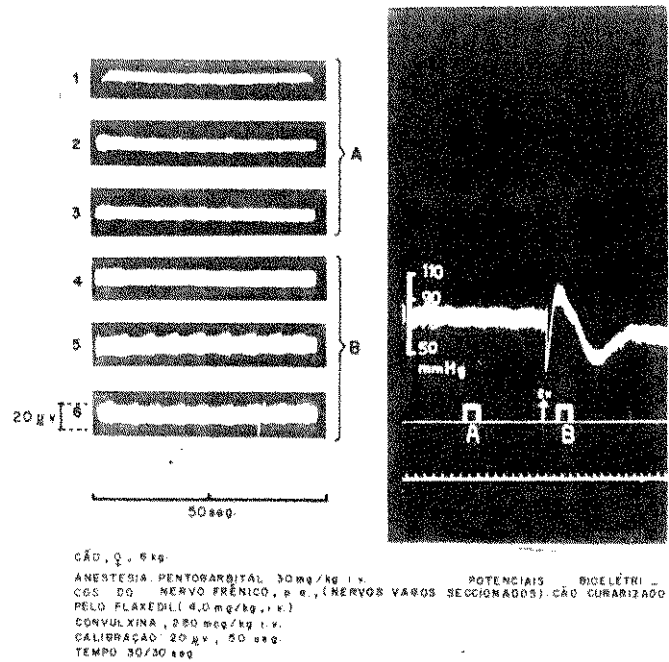
FIGURA 15



Nos animais cujos vagos haviam sido previamente seccionados, observou-se apenas a fase de aumento de frequência; o período

de silêncio, correspondente à apnéia, foi abolido (fig. 16).

FIGURA 16



Desnervação dos seios carotídeos. Em cães anestesiados, a desnervação dos glomos carotídeos e secção dos nervos vagos foi capaz de

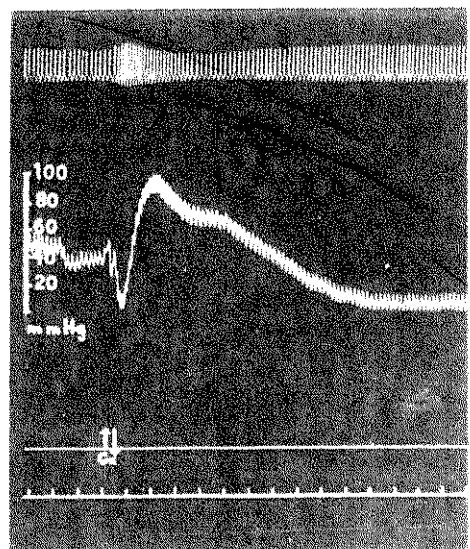


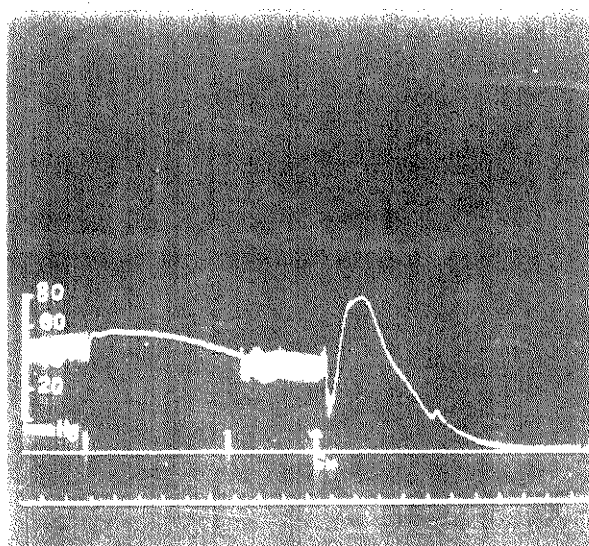
FIGURA 17

abolir ou reduzir em muito a estimulação respiratória causada pela convulxina (fig. 17).

ESTUDO DAS CAUSAS DAS PERTURBAÇÕES CIRCULATÓRIAS.

Destruição do sistema nervoso central. A destruição do sistema nervoso central, comprovada pela prova de asfixia, não modificou os efeitos imediatos da convulxina (fig. 18). A queda inicial e a elevação da pressão arterial foram comparáveis às que se obtêm em cães com o sistema nervoso central íntegro. Observa-se, apenas, o aparecimento de um terceiro efeito: hipotensão secundária comparável à produzida pela peçonha (fig. 18).

FIGURA 18

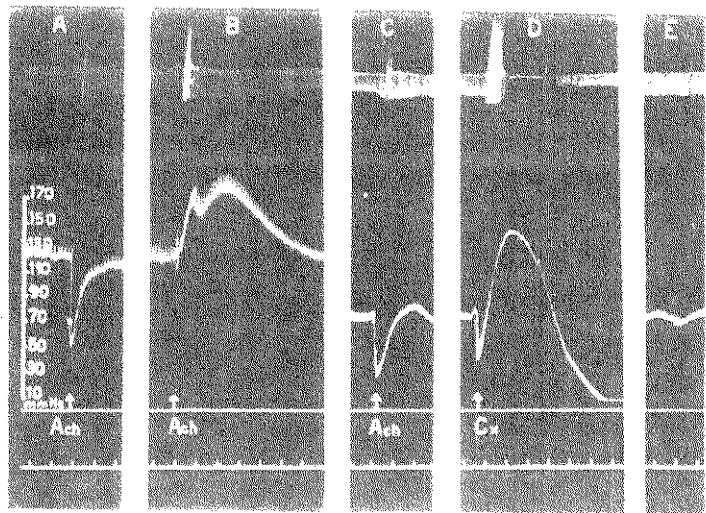


CÃO, ♂, 5,0 kg
ANESTESIA PENTOBARBITAL 30mg/kg, i.v.
DESTRUIÇÃO DO S.N.C. (SOLUÇÃO A 20% DE NaCl, SOB PRESSÃO DE 60 cm DE Hg DURANTE 6 min.)
CONVULXINA 0,2 mg/kg, i.v.
TEMPO - 30/30649

Bloqueio ganglionar. Cães atropinizados e sob bloqueio ganglionar produzido pelo brometo de hexametônio, responderam à injeção venosa de convulxina de modo semelhante ao dos animais com o sistema nervoso

so central destruído: hipotensão imediata, efeito pressor acentuado seguido de hipotensão duradoura (fig. 19).

FIGURA 19



Cão, 2,6 kg
ANESTESIA: PENTOBARBITAL 30 mg/kg, i.v.
SEQUÊNCIA DAS DROGAS (i.v.)
A ACh - 100
ENTRE (A) e (B) - ATROP 2 mg/kg
B ACh - 5 mg
ENTRE (B) e (C) - Cx - 2 mg/kg
C ACh - 5 mg
D Cx - 0,25 mg/kg
E RECUPERAÇÃO AO FIM DE 30 min
TEMPO: 30/30 seg.

Bloqueio dos receptores α -adrenérgicos. A convulxina, administrada a cães cujos α -receptores encontravam-se bloqueados, provocou seus efeitos característicos na pressão arterial: queda inicial e



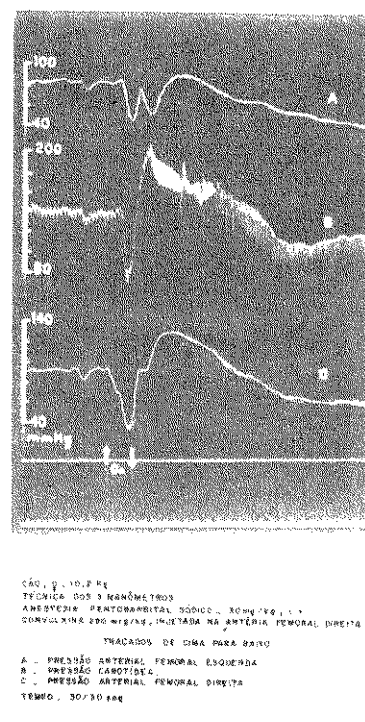
FIGURA 20

Cão, 2,6 kg
ANESTESIA: PENTOBARBITAL 30 mg/kg, i.v.
A ACh - 100 mg/kg
B ACh - 5 mg/kg
C ACh - 5 mg/kg
D Cx - 0,25 mg/kg
E RECUPERAÇÃO AO FIM DE 30 min
TEMPO: 30/30 seg.

hipertensão, seguidos de volta ao normal. A fig. 20 ilustra o fato. Observe-se que o efeito da adrenalina achava-se invertido e o da noradrenalina abolido.

Medidas simultâneas das pressões arteriais, central e periférica. A injeção de convulxina na artéria femoral causou um abaixamento da pressão periférica local que precedeu o da pressão carotídea (fig. 21). O efeito pressor foi em geral mais nítido na pressão central. Os registros das pressões periféricas mostraram efeito hipotensor secundário mais acentuado e prolongado que o da pressão carotídea.

FIGURA 21



ALTERAÇÕES ELETROCARDIOGRÁFICAS. Dos 12 animais estudados, 9 apresentaram bradicardia, em diferentes graus, indo até parada cardíaca transitória (2); houve aparecimento de arritmias em alguns casos (4) e bloqueio átrio ventricular em um animal. Os três animais que

tiveram ambos os vagos seccionados não apresentaram qualquer alteração (tab. VI).

ALTERAÇÕES NO ELETROCARDIOGRAMA DE CÃES, APÓS INJEÇÃO VENOSA DE 250 mg/kg DE CONVULXINA. GRUPO CONTRÔLE: 9 ANIMAIS; APÓS SECÇÃO DOS VAGOS: 3 ANIMAIS.

ALTERAÇÕES	% DE ANIMAIS	
	GRUPO CONTRÔLE (9)	APÓS SECÇÃO DOS VAGOS (3)
BRADICARDIA	100	0
PARADA CARDÍACA TRANSITÓRIA	22	0
ARRITMIAS	44	0
BLOQUEIO A/V	11	0

TABELA VI

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram ter sido isolada da peçonha da cascavel sul-americana uma nova neurotoxina, denominada convulxina, cujas ações farmacológicas diferem das exercidas pela crotoxina, crotactina, crotamina e giroxina. Na tabela VII acham-se referidos os principais efeitos produzidos pela convulxina e neurotoxinas anteriormente isoladas, assim como sua toxicidade relativa e seu comportamento frente à diálise em celofane.

TABELA VII

	E FEITOS							
	CONVULSÕES	PARALISIA	PERTURBAÇÕES RESPIRATÓRIAS PRECOSES	DEPRESSÃO CIRCULATÓRIA PRECOSES	ATIVIDADE CONVULSANTE	ATIVIDADE KENOESTICA	TOXICIDADE PARA CAMURÇONOS	DIALISE
CONVULXINA	CLÔNICAS ou TÔNICAS-LONGAS	"	PRESENTE	PRESENTE	"	"	+	NÃO DIALISA
CROTOXINA	"	PLÁGICA	"	HIPOTENSÃO DISCRETA	"	PRESENTE	+++	NÃO DIALISA
CROTACTINA	"	PLÁGICA	"	"	"	"	+++	NÃO DIALISA
GIROXINA	DE TIPO CONVULSIVO	"	"	HIPOTENSÃO DISCRETA	PRESENTE	"	++	NÃO DIALISA
CROTAMINA	"	COM INIBIÇÃO MUSCULAR	"	"	"	"	+	DIALISA

NOTA - O SINAL + INDICA GRÁU DE EFEITO

A natureza proteica da convulxina foi comprovada com os métodos do biureto e de Lowry. Como a crotoxina, cuja natureza pro

teíca acha-se bem determinada^{14,15,20,27}, a convulxina apresenta as seguintes propriedades: é precipitada pelo sulfato de amônio, é incapaz de atravessar os poros das membranas de diálise, migra em campo eletroforético, apresenta espectro de absorção em ultravioleta com extinção alta em 2 800 Å e é antitoxinogênica. Em Sephadex G-100, contudo, a convulxina é excluída no "void volume", enquanto a crotoxina é retida. Este fato sugere para a convulxina peso molecular superior a 30 000, que é o valor encontrado para a crotoxina²⁰. Também em gel de ágar, a difusão e a forma das linhas de precipitação das duas toxinas indicam peso molecular maior²⁴ para a convulxina.

À imunoeletroforese, a convulxina apresenta todas as características de pureza imunológica. Nas mesmas condições experimentais, a crotoxina cristalizada revela duas linhas de precipitação, correspondentes aos dois componentes que a constituem^{14,34}. Do ponto de vista farmacológico é bastante significativa a ausência de atividades coagulante e hemolítica na convulxina, pois indica a não contaminação pelo fator coagulante e pela fosfolipase.

Embora a convulxina tenha-se mostrado homogênea em Sephadex, o rendimento do processo foi baixo (15 a 16 por cento). A análise dos dados apresentados na tabela II (pag. 22) sugere ter havido perda de toxina, provavelmente por desnaturação na fase de precipitação pelo sulfato de amônio, seguida de diálise demorada (24 a 48 horas), razão pela qual outros métodos deverão ser utilizados. Quanto à purificação de 5,3 é da ordem de grandeza da encontrada por Gomez e Diniz¹⁸, para componente tóxico da peçonha de Tytius serrula

tus.

A convulxina é, em geral, menos tóxica do que a peçonha e a crotoxina. Em espécies muito sensíveis como coelhos e, possivelmente, gatos, sua toxicidade é maior do que a da peçonha e semelhante à da crotoxina. Verifica-se para a crotoxina e peçonha que a dose letal por administração venosa e subcutânea^{6,45} apresenta apenas pequena diferença (1:2, 1:4). Para a convulxina, a diferença é muito acentuada. Doses correspondentes a cinquenta vezes a DL 50, por via venosa, não produzem efeitos quando injetados por via intraperitoneal em camundongos. Este aumento considerável quando da utilização de outras vias, reflete, provavelmente, a dificuldade de absorção relacionada à natureza, tamanho, forma ou carga de suas moléculas.

Em cães, a administração da convulxina provoca, além de efeitos precoces, crises convulsivas que se manifestam tardiamente. Convulsões já tinham sido observadas, nesta espécie animal, por Vital Brazil após a injeção venosa da peçonha e nunca após administração intramuscular ou subcutânea. O tempo de latência necessário para o aparecimento de convulsões é de cinquenta minutos a duas horas para a fração I⁴⁹. Com a convulxina observa-se latência de vinte e quatro horas o que sugere a existência de componente ou componentes que atuem facilitando o acesso da convulxina ao sistema nervoso central. É oportuno lembrar que, dessa fração isolou-se a deltatoxina capaz de alterar profundamente o valor hematócrito em cães⁵⁰.

Houssay e Hug²² verificaram que a administração da peçonha da cascavel sul-americana na veia do cão perfusor causava perturbações respiratórias precoces na cabeça sobrevivente, perfundida, do cão receptor. Deduziram dessa experiência, que a peçonha crotálica atuava diretamente nos centros respiratórios, fato que influenciou Houssay²³ a classificá-la como neurotóxica. Contudo, os dados experimentais obtidos com a convulxina demonstram a natureza periférica das perturbações respiratórias, isto é, que estas resultam da estimulação de receptores pulmonares, aórticos e dos glomos carotídeos.

Para afastar-se a hipótese de que a fase de apnéia fôsse consequência da intensa estimulação respiratória, cães curarizados, sob respiração artificial, tiveram os potenciais bioelétricos do nervo frênico revelados na tela do osciloscópio. Nesses animais observava-se, imediatamente após a injeção de convulxina, um aumento na frequência das descargas de potenciais, seguido de silêncio elétrico. Somente quando se proceda, previamente, à secção dos nervos vagos, não se observa a diminuição em sua frequência. A apnéia deve resultar, portanto, da estimulação de receptores pulmonares capazes de enviar impulsos frenadores através de fibras sensitivas vagas, a exemplo do que ocorre no reflexo de Hering-Breuer. A apnéia precoce, produzida pela nicotina e pela serotonina, obedece ao mesmo mecanismo^{2,25}. O fato de a desnervação dos glomos carotídeos e secção dos nervos vagos terem abolido a fase de estimulação respiratória sugere que o aumento de frequência seja resultante da estimulação dos quimiorreceptores. Ambos os fenômenos podem traduzir ação da pró-

pria convulxina ou de substância por ela liberada.

Dentre as toxinas isoladas da peçonha de Crotalus duris
sus terrificus somente a convulxina produz queda imediata e abrupta
da pressão arterial, seguida de hipertensão, em geral, acentuada.
Feldberg¹² observou, quando da injeção venosa da peçonha de Naja na-
ja, uma vasoconstrição na área pulmonar responsável pela hipotensão
sistêmica que se verifica. Na periferia, a peçonha de N. naja pro-
move também vasoconstrição. No caso da convulxina, comprova-se,
pelo método dos três manômetros que na periferia manifesta-se, inici-
almente, o efeito hipotensor. A queda inicial deve ser consequen-
te, portanto, a uma vasodilatação periférica devida à ação direta
da toxina ou de substância por ela liberada. A histamina não parti-
cipa desse efeito. A prontidão com que se inicia a queda de pres-
são (inferior a dez segundos³⁸), bem como a ausência de hemoconcen-
tração ou de alterações na permeabilidade capilar exclui esta possi-
bilidade.

A hipertensão causada pela convulxina é semelhante à pro-
duzida pela peçonha da cascavel sul-americana. Tanto a peçonha⁴³,
como a convulxina provoca este efeito em animais com o sistema nervo-
so central destruído, sob a ação de ganglioplégicos ou de -bloquea-
dores adrenérgicos. A hipertensão não é resultante, portanto, de
ações centrais, isto é, não se relaciona com a estimulação do centro
vasomotor; não depende também da estimulação dos gânglios simpáti-
cos, podendo-se afastar a idéia de ação excitonicotínica. Finalmen-
te, é possível excluir quaisquer ações simpatomiméticas na gênese

do efeito hipertensor porquanto, êste se manifesta em animais injetados com droga simpatolítica em que a ação da adrenalina acha-se invertida e a da noradrenalina, abolida. A hipótese de Vellard e Huidobro⁴² que correlaciona a fase hipertensora à apnéia asfíxica, deve ser abandonada não só porque a participação de catecolaminas no efeito se acha excluída mas também porque a hipertensão se manifesta em animais curarizados sob respiração artificial. Conclui-se, portanto, que o efeito hipertensor é devido à ação direta da convulxina ou de substâncias por ela liberadas sobre a musculatura lisa dos vasos sanguíneos.

O efeito hipertensor secundário manifesta-se acentuadamente apenas em cães com o sistema nervoso central destruído ou sob ação de ganglioplégicos. Êstes dados indicam que os mecanismos responsáveis pela homeostase são, em geral, suficientes para compensar a ação vasodilatadora da toxina.

A injeção venosa de peçonhas de cascavéis de certas regiões produz apenas hipotensão e não o tríplice efeito⁴². Esta variedade foi encontrada em peçonha de cascavéis da província argentina de Santiago del Estero⁴³. A suspeita de que a peçonha proveniente de cascavéis dessa região era desprovida de convulxina ficou comprovada através de reações serológicas. Com efeito, nela não se encontraram traços de convulxina. A presença ou a ausência de convulxina representa, portanto, mais uma variação regional na composição da peçonha da cascavel sul-americana, variação esta que não coincide com a relacionada à presença ou a ausência de crotamina.

Alterações eletrocardiográficas iguais às descritas quando da administração de doses altas de peçonha⁴¹, foram observadas após a injeção de convulxina em cães. Abolindo estes efeitos, a secção dos nervos vagos revelou a sua natureza reflexa.

No decurso de casos graves de envenenamento crotálico no homem, podem ocorrer movimentos convulsivos ou profundo torpor. J. Sigaud faz referências em sua observação clássica, transcrita por Vital Brazil⁸, de um leproso que se deixou picar por cascavel na esperança de obter a cura para seu mal a "movimentos involuntários no polegar da mão direita e na perna esquerda", a "movimentos convulsivos do maxilar e das extremidades inferiores", a "aumento dos movimentos convulsivos", etc. Wajchenberg e colaboradores⁵¹, ao descreverem casos graves de envenenamento crotálico, referem-se a fases de agitação, bem como a estados de torpor. É possível que a convulxina participe na gênese desses efeitos.

CONCLUSÕES

1. Separou-se da peçonha da Crotalus durissus terrificus uma nova neurotoxina, denominada "convulxina", que se revelou homogênea em experiências de filtração molecular em Sephadex, imunodifusão e imunoeletroforese.
2. A convulxina é de natureza proteica e antitoxinogênica.
3. Os efeitos produzidos pela convulxina no organismo animal são característicos e diferem daqueles causados pelas toxinas já separadas da peçonha da cascavel sul-americana.
4. Os fenômenos convulsivos assim como os distúrbios circulatórios e respiratórios precoces anteriormente revelados em pesquisas sobre as propriedades farmacológicas da peçonha da C. d. terrificus são causados pela convulxina.
5. As perturbações respiratórias produzidas pela convul-

xina são de natureza reflexa e têm origem em ações dessa toxina ou de substâncias por ela liberadas em receptores pulmonares, da crossa da aorta e dos glomos carotídeos.

6. As alterações da pressão arterial produzidas pela convulxina são devidas a fenômenos de vasodilatação e vasoconstricção no sistema vascular periférico, os quais têm origem em ações diretas da toxina ou de substâncias por ela liberadas na musculatura lisa arteriolar.

7. As perturbações cardíacas subsequentes à injeção de convulxina são de natureza reflexa uma vez que desaparecem pela secção dos nervos vagos.

8. A convulxina falta em peçonhas da C. d. terrificus de algumas regiões, condicionando, portanto, a sua presença ou a sua ausência mais uma variação regional, possivelmente genética, na composição da peçonha dessa subespécie.

9. A convulxina provavelmente participa na gênese de movimentos convulsivos e estados de torpor que se podem observar em casos graves de envenenamento crotálico no homem.

R E S U M O

Certas perturbações motoras, respiratórias e circulatórias causadas pela peçonha da Crotalus durissus terrificus não são devidas à ação das neurotoxinas anteriormente descritas (crotoxina, crotactina, giroxina ou crotamina). Esta verificação motivou a pesquisa e conduziu à separação de componente que, por suas propriedades convulsionantes, foi denominado "convulxina".

O seguinte processo tem sido empregado na obtenção dessa toxina: precipitação da peçonha com o grau de saturação de 0,45 em sulfato de amônio, seguida de diálise contra água destilada e filtração em gel de dextrana, altamente poroso (Sephadex G-100 e G-200). A homogeneidade da toxina, assim obtida, foi comprovada por filtração molecular, imunodifusão e imunoeletroforese em gel de ágar. O rendimento em convulxina tem sido de 15-16% e a purificação de 5,3.

A convulxina é de natureza proteica, não dialisável e antitoxinogênica. Desprovida de atividades coagulante, hemolítica, fosfolipásica e proteolítica, é incapaz de alterar a permeabilidade capilar e o valor hematócrito.

Camundongos injetados por via venosa com doses pequenas

de convulxina apresentam, dentro de vinte segundos, taquipnéia, seguida de apnéia de curta duração. Doses maiores provocam convulsões que terminam, frequentemente, com a morte do animal. A DE 50 (efeito considerado: apnéia de curta duração) é de 180 (140 a 231) $\mu\text{g/kg}$ e a dose letal mediana de 524 (476 a 803) $\mu\text{g/kg}$. Em cães, a convulxina produz efeitos precoces (excitação traduzida por latidos, perda de equilíbrio, perturbações respiratórias, nistagmo) e efeitos tardios (convulsões clônicas). Em gatos observam-se apenas efeitos precoces (perda de equilíbrio, perturbações respiratórias, nistagmo, convulsões etc.). A DE 50 (efeito considerado: convulsões) para esta espécie animal, é de 83,3 (35,6 a 135) $\mu\text{g/kg}$ por via venosa. Em cobaias, a convulxina administrada por via intraperitoneal em doses de 1000 a 2 000 $\mu\text{g/kg}$ provoca fenômenos de excitação após latência de uma hora e morte em apnéia, dentro de dez horas.

Para o lado do aparelho respiratório, a convulxina provoca distúrbios agudos semelhantes aos causados pela peçonha, isto é, breve fase de taquipnéia seguida de apnéia. Durante o período de apnéia não se demonstram descargas de potenciais no nervo frênico. A fase de taquipnéia é suprimida pela desnervação dos glomos carotídeos e secção dos nervos vagos; a secção destes é suficiente para abolir a apnéia. Ambos os fenômenos são, portanto, de natureza reflexa e devidos a ações da convulxina ou de substâncias por ela liberadas em receptores pulmonares, aórticos e dos glomos carotídeos.

Em cães anestesiados, a injeção de convulxina como a da

peçonha produz, dentro de dez segundos, queda abrupta e fugaz da pressão arterial, seguida de efeito pressor de curta duração. A destruição do sistema nervoso central, o bloqueio dos gânglios autonômicos, dos receptores α -adrenérgicos e dos receptores muscarínicos não altera estes efeitos que são devidos, portanto, à ação direta da toxina ou de substâncias por ela liberadas, na musculatura lisa dos vasos sanguíneos. As perturbações cardíacas, semelhantes às produzidas pela peçonha, são abolidas pela secção na região cervical de ambos os nervos vagos o que demonstra sua natureza reflexa.

A peçonha das cascavéis da província argentina de Santiago del Estero é desprovida de convulxina. Assim, a presença ou ausência desta toxina condiciona mais uma variação regional na composição da peçonha da C. d. terrificus.

A participação da convulxina na fisiopatologia do envenenamento crotálico no homem é sugerida pela ocorrência, em casos graves de acidentes provocados pela cascavel sul-americana, de movimentos convulsivos e/ou estados de profundo torpor.

REFERÊNCIAS

1. ARTHUS, M.- Recherches expérimentales sur le venin de Buthus quinquestriatus. C. R. Acad. Sci.(Paris), 156: 1256, 1913.
2. AVIADO, D. M.- Ganglionic stimulant and blocking drugs. In Drill's Pharmacology in Medicine. 3rd. ed. New York, Mc Graw-Hill, 1965, p. 526.
3. BARRIO, A. & VITAL BRAZIL, O.- Neuromuscular action of the Crotalus terrificus terrificus(Laur.) poisons. Acta Physiol. Lat. Amer., 1: 291, 1951.
4. BARRIO, A.- Gyroxin, a new neurotoxin of Crotalus durissus terrificus venom. Acta Physiol. Lat. Amer., 11(4): 224, 1961.
5. BRAZIL, V.- Contribuição ao estudo do veneno ophidico. Rev. Med. de São Paulo, 4: 296, 1901.
6. BRAZIL, V. & PESTANA, B. R.- Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. Rev. Med. de São Paulo, 12: 415, 1901.
7. BRAZIL, V.- Dosagem do valor anti-toxico dos serums anti-peçonhentos. Rev. Med. de São Paulo, 22: 119, 1909.
8. BRAZIL, V.- La défense contre l'Ophidisme. 2 éme. éd. São Paulo, Pocai & Weiss, 1914. p. 118-121.

9. BRAZIL, V. & VELLARD, J.- Action coagulante et anticoagulante des venins. Ann. Inst. Pasteur(Paris), 42: 403, 1928.
10. CESARI, B. & BOQUET, E.- Recherches sur les antigènes des venins et des anticorps des sérums antivenimeux. Venin de Vipera aspis et sérums antivipérins (V. aspis). Ann. Inst. Pasteur(Paris), 55(3): 307, 1935.
11. CHEYMOL, J., BOURILLET, F. & ROCH, M.- Action neuromusculaire des venins de quelques Crotalidae, Elapidae et Hydrophiidae. Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac., 33(2): 541, 1966.
12. FELDBERG, W. & KELLAWAY, C. H.- Circulatory effects of the venom of the indian cobra (Naja naja) in cats. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 15: 159, 1937.
13. FOLIN, O. & CIOCALTEU, V.- Tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J. Biol. Chem., 73: 627, 1927.
14. FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B.- Fractionation and composition of crotoxin. Arch. Biochem., 60: 64, 1956.
15. FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B.- Recent chemical studies on crotoxin. In: Buckley, E. E. & Porges, N., Ed. Venoms. Washington, D. C., 1956. p. 259.
16. GALVÃO, P.E. & PEREIRA Jr., J.- Estudo das condições para a completa destruição de todo sistema nervoso central nos mamíferos. Arch. do Inst. Biológico, 13: 1, 1942.
17. GAUTRELET, J.- Eléments de techniques physiologiques. Masson et Cie., Editeurs, 1932. p. 72-75 e 111-114.
18. GOMEZ, M. V. & DINIZ, C. R. - Separation of toxic components from the brazilian scorpion - Tityus serrulatus - venom. Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac., 33(3): 899, 1966.

19. GRABAR, P. & WILLIAMS, C. A.- Méthode permettant l' étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim. et Biophys. Acta, 10: 193, 1953.
20. GRALÉN, N. & SVEDBERG, T.- The molecular weight Crotoxin. Biochem. J., 32: 1375, 1938.
21. HABERMANN, E.- Gewinnung und eigenschaften von Crotactin, Phospholipase A, Crotamin und "Toxin III" aus dem gift der brasilianischer klapperschlange. Biochem. Z., 329: 405, 1957.
22. HOUSSAY, B. A. & HUG, E.- Action de l'apomorphine et du venin de crotale sur les centres respiratoires et vagues de la tête isolée. C. R. Soc. Biol.(Paris), 99(32): 1509, 1928.
23. HOUSSAY, B. A.- Classification des actions des venins de serpents sur l'organisme animal. C. R. Soc. Biol.(Paris), 105: 308, 1930.
24. KORNGOLD, L. & VAN LEEUWEN, G.- The effect of the antigen's molecular weight on the curvature of the precipitin line in the Duchterlony technic. J. Immun., 78: 172, 1957.
25. KOTTEGODA, S. R. & MOTT, J. C.- Cardiovascular and respiratory actions of 5-hydroxytryptamine in the cat. Br. J. Pharmacol., 10: 66, 1955.
26. KUNITZ, M.- Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol., 30: 291, 1946.
27. LI, C. H. & FRAENKEL-CONRAT, H.- Electrophoresis of Crotoxin. J. Amer. Chem. Soc., 64: 1586, 1942.
28. LIMONGI, J. P.- Contribuição para a farmacodinâmica de ácidos benzeno-selenínico, orto-carboxibenzeno selenínico e benzeno-seleno-

- nínicos monoclóro substituídos. Tese de Livre-docência, Fac. Med. U.S.P., 1954.
29. LOWRY, O. H. et al.- Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
30. MOURA GONÇALVES, J. & POLSON, A.- The electrophoretic analysis of snake venoms. Arch. Biochem., 13: 253, 1947.
31. MOURA GONÇALVES, J. & VIEIRA, L. G.- Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. An. Acad. Bras. Ciências, 22: 141, 1950.
32. MOURA GONÇALVES, J.- Purification and properties of Crotamine. In: Buckley, E. E. & Porges, N., Ed., Venoms. Washington, D. C., 1956.
33. MOUSSATCHÉ, H. & VIEIRA, G. D.- Sobre o mecanismo da contratura produzida pelo veneno de cascavel (Crotalus durissus terrificus). An. Acad. Bras. Ciências, 25: 249, 1953.
34. NEUMANN, W. P. & HABERMANN, E.- Über Crotactin, das haupttoxin des giftes der brasilianischen klapperschlange (Crotalus terrificus). Biochem. Z., 327: 170, 1955.
35. OHSAKA, A.- Proteolytic activities of Habu snake venom and their separation from lethal toxicity. Jap. J. Med. Sci. Biol., 13: 33, 1960.
36. OLIVEIRA, A. R.- Serologia aplicada ao estudo de vírus do anel do pimentão. Tese de doutoramento, E. S. A. "Luiz de Queiroz", U.S.P., Piracicaba, 1967.
37. OUCHTERLONY, O.- Antigen-antibody reactions in gels. Acta Path. Microbiol., 26: 507, 1949.

38. PATON, W. D. M.- Histamine release by compounds of simple chemical structure. *Pharmacol. Rev.*, 9: 269, 1957.
39. RANGEL, H.- Comunicação pessoal.
40. SLOTTA, K. & FRAENKEL-CONRAT, H.- Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan*, 12: 505, 1938-1939.
41. SOAJE-ECHAGUE, E.- Alteraciones circulatorias producidas por el veneno de Crotalus terrificus. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 16: 475, 1940.
42. VELLARD, J. & HUIDOBRO, F.- Accion comparada de diversos venenos de ofidicos sobre la pression arterial. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 17: 72, 1941.
43. VITAL BRAZIL, O.- Hiperpielese provocada pela peçonha da Crotalus terrificus terrificus. *An. Fac. Med. U.S.P.*, 28: 159, 1954.
44. VITAL BRAZIL, O.- Comunicação pessoal.
45. VITAL BRAZIL, O., PRADO-FRANCESCHI, J. & WAISBICH, E.- Pharmacology of crystalline Crotoxin. I. Toxicity. *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, 33(3): 973, 1966.
46. VITAL BRAZIL, O.- Pharmacology of crystalline Crotoxin. II. Neuro muscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, 33(3): 981, 1966.
47. VITAL BRAZIL, O. et al.- Pharmacology of crystalline Crotoxin. III. Cardiovascular and respiratory effects of Crotoxin and Crotalus durissus terrificus venom. *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, 33(3): 992, 1966.
48. VITAL BRAZIL, O. & HADLER, W.- Pharmacology of crystalline Crotoxin.

IV. Nephrotoxicity. Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.,
33(3): 1001, 1966.

49. VITAL BRAZIL, O., PRADO-FRANCESCHI, J. & WAISBICH, E.- Fator neurotóxico diferente da crotoxina e da crotamina. *Ciência e Cultura*, 19(4): 658, 1966.
50. VITAL BRAZIL, O. & PRADO-FRANCESCHI, J.- Convulxina e deltatoxina: duas novas neurotoxinas na peçonha da C. d. terrificus. Comunicação apresentada à XX Reunião da S.B.P.C. (7 a 13/07), 1968.
51. WAJCHEMBERG, B. L., SESSO, J. & INAGUE, T.- Feições clínico-laboratoriais do envenenamento crotálico humano. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, 1: 179, 1954.
52. WEICHSELBAUM, T. E.- Accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Amer. J. Clin. Path. Suppl.*, 10: 40, 1946.
53. WEIL, C. S.- Tables for convenient calculation of median effective dose (LD 50 or ED 50) and instruction in their use. *Biometrics*, 8: 249, 1952.