

TDBr — ATIVIDADE BLOQUEADORA GANGLIONAR E NEUROMUSCULAR

TDBr — GANGLIONIC AND NEUROMUSCULAR BLOCKING ACTIVITY

VIRILIO AUGUSTO FORTES *

RECEBIDO EM 22/01/73
APROVADO EM 20/03/73

INTRODUÇÃO

O TDBr, um brometo de trimetil amônio com ação antitussígena seletiva, estudada experimentalmente por Plisnier (6) e com aplicação clínica iniciada por Ghidini (4), apresenta estrutura química que se assemelha à das de várias substâncias farmacologicamente ativas sobre receptores colinérgicos. As características estruturais desta substância, levaram o autor a pesquisar sua provável atividade em sinapses ganglionares autonômicas e neuromusculares, cujos resultados serão descritos no presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados — Quinze cães adultos de ambos os sexos, com peso variando de 5 a 12 kilogramas e de raças variadas. Oito cobaias de ambos os sexos, com peso entre 400 e 600 gramas, com raças variadas. Oito ratos com peso de 300 a 350 gramas da raça Wistar. Oito pintos de ambos os sexos, com 1 mês de idade, da raça Legorn, com pesos de 150 a 170 gramas.

Preparações biológicas — 1 — Registro da pressão arterial carotídea em cães anestesiados — Os cães foram anestesiados com pentobarbital sódico aplicado por via intravenosa, utilizando-se a veia radial para este fim. Uma das artérias carótidas primitivas foi canulada e conectada a um manômetro de Ludwig e o registro das variações tensionais foi feito em quimógrafo com papel esfumado. Todos os animais foram vagotomizados bilateralmente e em algumas experiencias o nervo vago direito foi preparado para esti-

* Professor Adjunto de Farmacologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Paraná.

mulação elétrica pré-ganglionar. Os estímulos foram fornecidos por estimulador de ondas retangulares, Palmer (modelo H 45), com 2 volts, 10 ciclos por segundo, durante 10 segundos. A traqueia foi canulada para instalação de respiração artificial que foi aplicada, quando julgada necessária, por bomba de pressão positiva. Uma veia safena foi canulada com tubo de polietileno para a aplicação de drogas.

2 — Ileo isolado de cobaia — Os animais foram sacrificados por pancada na nuca e imediatamente sangrados por secção dos vasos do pescoço. A seguir o abdomen foi aberto com tesoura e uma porção de cerca de 10 centímetros do íleo terminal foi retirada e lavada internamente com Tyrode em temperatura ambiente, para a retirada de restos fecais. Pequenos segmentos de 1,5 a 2 centímetros de extensão foram utilizados em cubas perfusoras com capacidade de 5 mililitros. Como líquido perfusor foi empregado o Tyrode à temperatura de 33 graus centígrados e arejado com borbulhador elétrico.

3 — Preparação neuromuscular em cães anestesiados — Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico aplicado por via intravenosa. A traquéia foi canulada para a instalação de respiração artificial e uma veia safena foi preparada com cânula de polietileno para aplicação de drogas. A seguir foi procedida à preparação neuromuscular: ciático popliteo externo-tibial anterior. Após o isolamento e secção do nervo, sua extremidade distal foi disposta em eletrodos impolarizáveis de platina e estímulos maximais e tetanizantes foram utilizados, sendo fornecidos por estimulador de ondas retangulares, Palmer (Modelo H 45). A duração foi de 0,5 milisegundos em frequências de 5 ou 10 por minuto ou de 50 por segundo, nos estímulos tetanizantes. As contrações do músculo tibial anterior foram obtidas pela fixação de seus tendões em alavanca isométrica e registradas em quimógrafo com papel esfumado. A respiração artificial foi instalada e mantida durante os bloqueios neuromusculares completos ou quando julgada necessária.

4 — Preparação neuromuscular em ratos anestesiados — A anestesia geral dos ratos foi obtida pela aplicação intraperitoneal de pentobarbital sódico. A traquéia foi canulada para instalação de respiração artificial. A preparação ciático-gastrocnêmio foi realizada isolando-se o nervo ciático que, após ser seccionado, foi disposto em eletrodos para receber estímulos maximais ou tetanizantes. O músculo gastrocnêmio foi liberado de suas inserções distais e fixado a alavanca isométrica; suas contrações foram registradas em quimógrafo com papel enfumado. Os estímulos, fornecidos por estimulador de

ondas retangulares, Palmer (modelo H45), foram aplicados com duração de 0,5 milisegundos, em frequências de 5 a 10 por minuto e de 50 por segundo nos estímulos tetanizantes. Em algumas experiências foram utilizados estímulos diretos sobre o músculo. A veia dorsal do pênis foi canulada para a aplicação de drogas e respiração artificial foi mantida quando julgada necessária.

5 — Estudo de atividade neuromuscular em pintos despertos — A aplicação do TDBr na massa muscular peitoral de pintos foi realizada para se observar efeito neuromuscular e com a finalidade especial de verificar o comportamento postural das aves durante a ação desta droga. Foi ainda utilizado, para estudo comparativo, um bloqueador neuromuscular do tipo despolarizante (succinilcolina) e um bloqueador do tipo estabilizador (galamina). Uma das experiências foi fotografada para o registro do comportamento postural das aves.

DROGAS E DOSES UTILIZADAS

- 1 Acetilcolina (C1-) — Lab. Roche. Soluções a 1 e 5 $\mu\text{g/ml}$, utilizadas em experiências com o íleo isolado de cobaia.
- 2 Bicarbonato de Sódio — Lab. Merck. Utilizado em solução a 200 mg/ml, em algumas experiências em cães e ratos, como antagonistas do TDBr, em doses de 200 mg/kg.
- 3 Cloreto de Cálcio — Lab. J.T. Baker. Solução a 100 mg/ml, utilizado em algumas experiências, como antagonista do TDBr, em doses de 50 mg/kg.
- 4 Galamina (Flaxedil) — Lab. Rhodia. Ampolas com 40 mg/ml. Utilizada em soluções a 10 e 20 mg/ml, em doses de 20 a 25 mg/kg, em experiências com pintos.
- 5 McN-A-343 — Cloreto de 4 — (m-clorofenilcarbamoiloxi) — 2 — butiniltrimetilamoneo). — Lab. McNeil. Solução a 1 mg/ml. Utilizado em doses de 50 a 100 $\mu\text{g/kg}$, em algumas experiências em cães.
- 6 Neostigmina (Prostigmine) — Lab. Roche. Ampolas com 0,5 mg em 1 ml. Utilizada em doses de 100 $\mu\text{g/kg}$, em algumas experiências em cães e ratos, como antagonista do TDBr.
- 7 Nicotina (SO_4^-) — Lab. J.T. Baker. Solução a 1 mg/ml, utilizada em algumas experiências com cães, em doses 20 a 50 $\mu\text{g/kg}$ e em soluções a 2,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$ em experiências com o íleo isolado de cobaia.
- 8 Nitrato de Uranila — Lab. Merck. Soluções a 60 mg/ml e 20 mg/ml utilizados como antagonistas do TDBr, em cães

e ratos respectivamente, em doses de 60 e 40 mg/kg, em algumas experiências.

- 9 Pentobarbital Sódico. Lab. Fontoura Wyeth. Solução a 30 mg/ml. Utilizado como anestésico geral, em doses de 30 mg/kg nas experiências com cães e 40 a 50 mg/kg nas experiências com ratos.
- 10 Succinilcolina (Quelicin) — Lab. Abbott. Soluções a 10 e 20 mg/ml, utilizada em algumas experiências com pintos, em doses de 12 a 15 mg/kg.
- 11 TDBr (Brometo de trimetil-(1,2-difeniletóxietil)-amoneo)— Lab. Pravez Recordati. Soluções: a 20 mg/ml, utilizada nas experiências com pintos; a 10 mg/ml, utilizada nas experiências com cães e ratos e a 5 e 10 μ g/ml, utilizadas nas experiências com íleo isolado de cobaia. As doses foram as seguintes: para cães e ratos 10 a 20 mg/kg, para pintos 25 a 30 mg//kg e, com íleo isolado, em concentrações finais de 0,1 a 0,3 μ g/ml.

SISTEMATIZAÇÃO DA PESQUISA

ESTUDO DA ATIVIDADE GANGLIONAR AUTONÔMICA DO TDBr

Sobre receptores do tipo muscarínico.

Influência do TDBr sobre a hipertensão arterial causada pelo McN-A-343. Em cães anestesiados, esta substância causa ligeira hipotensão arterial que é seguida de hipertensão mais intensa e duradoura. Este efeito decorre de estímulo ganglionar autonômico, em especial, dos gânglios do sistema simpático e da medular das supra-renais (7). A inibição das respostas pressoras do McN-A-343 pode ser usada por substâncias com atividade atropínica bem como por drogas, inclusive os anestésicos locais, que têm ação bloqueadora ganglionar em receptores muscarínicos. O McN-A-343 foi utilizado antes e após o emprego do TDBr com a finalidade de estudar a possível influência deste nas respostas tensionais causadas pelo primeiro.

Sobre receptores do tipo nicotínico.

A nicotina, em doses estimulantes ganglionares, em cães anestesiados, acarreta resposta pressora decorrente, em grande parte, de estímulo ganglionar autonômico e da medular das supra-renais, em receptores nicotínicos. A inibição destas respostas pode refletir ati-

vidade de substâncias bloqueadoras ganglionares sobre estes receptores. A nicotina foi assim, utilizada antes e após o emprego do TDBr, para o estudo de sua atividade com relação a receptores ganglionares do tipo nicotínico.

De acordo com Feldberg (2), a nicotina em certas concentrações contrai o íleo isolado de cobaia estimulando estruturas ganglionares parassimpáticas intramurais, o que permite o estudo de substâncias ganglioplégicas com atividade em receptores nicotínicos. A atividade bloqueadora se traduz pela inibição causada pela droga em estudo, sobre as contrações determinadas pela nicotina, porém sem interferir em contrações obtidas com outras substâncias de ação muscular lisa direta. As experiências com esta preparação foram realizadas procurando-se utilizar doses de TDBr que inibissem as contrações causadas no íleo pela nicotina, sem interferirem nas obtidas com a acetilcolina em baixas concentrações.

Em transmissão sináptica ganglionar parassimpática.

O estímulo elétrico pré-ganglionar, em determinadas estruturas, permite o estudo da atividade bloqueadora de certas substâncias, com relação à transmissão sináptica. Assim a estimulação de fibras nervosas pré-ganglionares do nervo vago em cães, causa queda abrupta da pressão arterial, que pode ser inibida por substâncias que bloqueiam os ganglios autonômicos. Por isso, a estimulação elétrica vaginal foi utilizada, em algumas experiências, com a finalidade de se observar a influência do TDBr com relação a transmissão ganglionar nesta estrutura parassimpática.

ESTUDO DA ATIVIDADE NEUROMUSCULAR DO TDBr

Preparação ciático-popliteo externo em cães anestesiados.

Esta preparação neuromuscular foi utilizada para o estudo da atividade neuromuscular do TDBr. A diminuição ou ausência de contrações musculares na vigência de estimulação nervosa intermitente, permitem a caracterização de atividade bloqueadora neuromuscular de substâncias curarizantes. A estimulação tetanizante pode ser seguida de alterações no miograma que podem orientar com relação ao mecanismo da ação bloqueadora. Desta forma o TDBr foi empregado, nestas experiências, durante o registro normal do miograma com intercalação de estímulos tetanizantes, antes e após o seu emprego. Em algumas experiências foram ensaiados como antagonistas das ações do TDBr, o cloreto de cálcio, o bicarbonato de sódio e o nitrato de uranila.

Preparação ciático-gastrocnêmio em ratos anestesiados.

Em ratos sob anestesia barbitúrica, foi procedido estudo experimental da atividade neuromuscular do TDBr. Foram utilizadas as contrações musculares por estímulo indireto, contrações tetânicas com estímulos indiretos em altas frequências e também contrações obtidas por estímulo muscular direto, antes e durante a ação do TDBr. Antagonismo com o cálcio, bicarbonato e uranila também foi experimentado.

Estudo da atividade neuromuscular em pintos despertos.

O comportamento postural destas aves durante a ação neuromuscular de substâncias curarizantes, pode diferenciar os mecanismos de ação da seguinte maneira: os curares estabilizadores ou competitivos, determinam relaxamento muscular do tipo flácido ao passo que curares despolarizantes apresentam paralisia muscular em que as aves adotam posição espástica característica. Por estas razões algumas experiências foram realizadas com o TDBr, em estudo comparativo com a galamina, representando os curares estabilizadores e com a succinilcolina, representando os curares despolarizantes.

RESULTADOS

ATIVIDADE BLOQUEADORA GANGLIONAR AUTONÔMICA DO TDBr

Sobre receptores muscarínicos.

O TDBr, em doses de 10 mg/kg de peso, em cães anestesiados, inibiu as respostas pressoras causadas pelo McN-A-343, demonstrando ação bloqueadora sobre receptores ganglionares do tipo muscarínico, como se observa na Fig. 1.

Sobre receptores nicotínicos.

Em cães anestesiados, doses de 10 mg/kg do TDBr, inibiram as respostas pressoras causadas pela nicotina (Fig. 2), revelando bloqueio de receptores ganglionares do tipo nicotínico.

As contrações do íleo isolado de cobaia, causadas pela nicotina em concentrações que variaram de 0,7 a 1,4 $\mu\text{g/ml}$, foram inibidas pelo TDBr em concentrações de 0,1 a 0,3 $\mu\text{g/ml}$, sem interferir em contrações causadas pela acetilcolina em concentrações de 0,01 a 0,03 $\mu\text{g/ml}$, apresentando atividade bloqueadora das estruturas ganglionares parassimpáticas do íleo de cobaia. Ver Fig. 3.

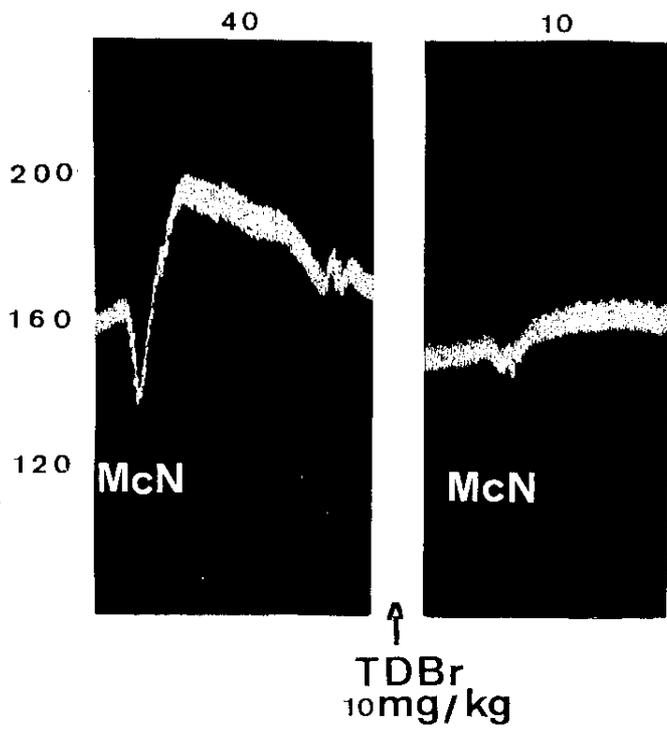


Fig. 1. Registro da pressão arterial carotídea em cão anestesiado. McN: McN-A-343, 50 ug/kg.

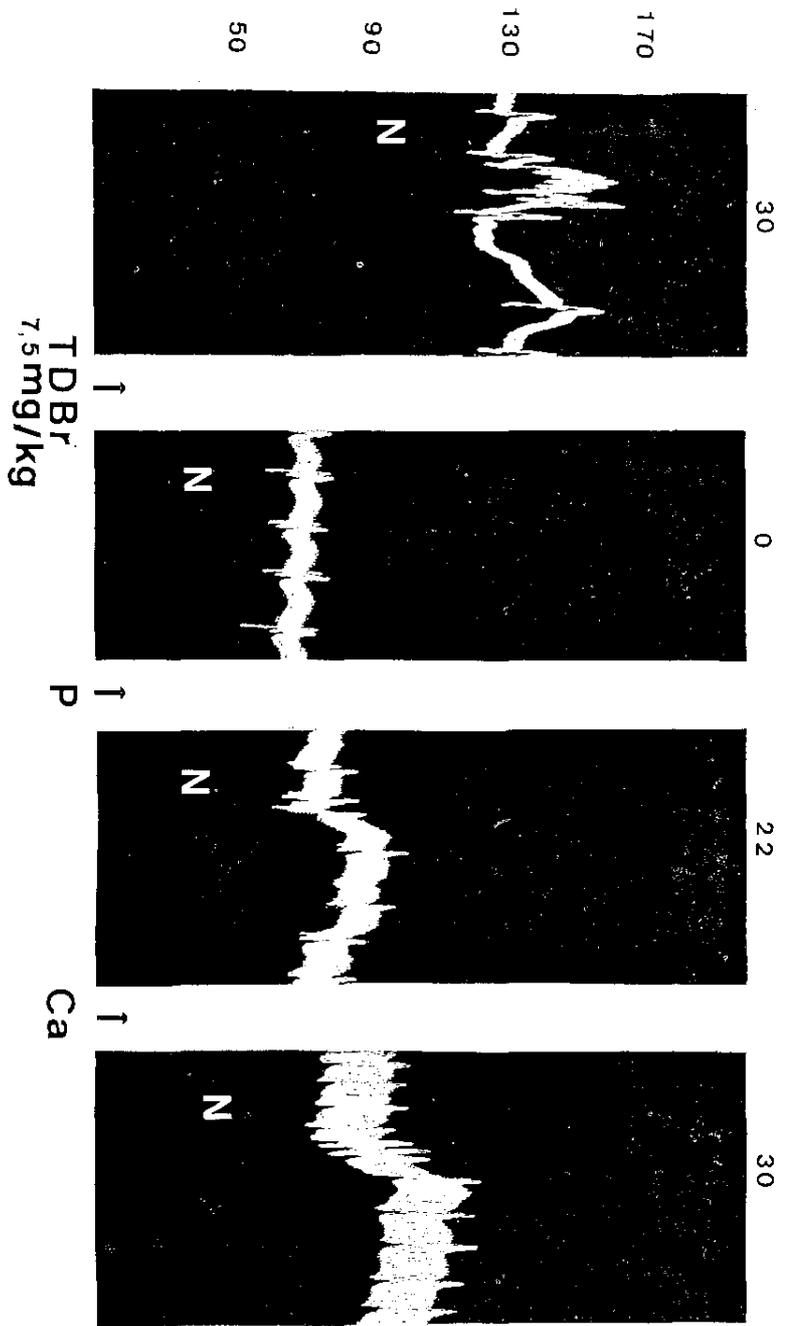
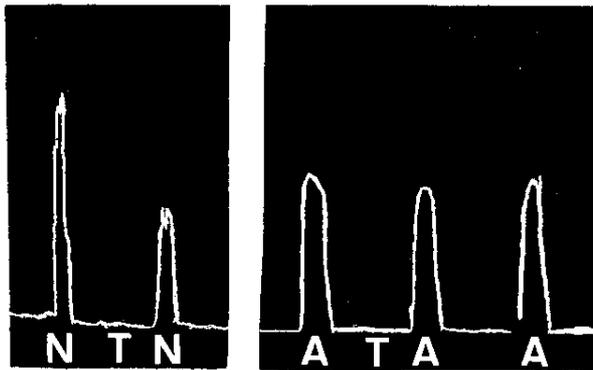


Fig. 2: Registro da pressão arterial carotídea em cão anestesiado. n: nicotina, 40 ug/kg. P: neostigmina, 100 ug/kg. Ca: cloreto de cálcio, 50 mg/kg.



T: 1,25
 N: 2,5 } mcg/5 ml
 A: 1

Fig. 3. Contrações do íleo isolado de cobaia. n: nicotina. T: TDBr. A: acetilcolina.

Em transmissão ganglionar parassimpática.

A queda da pressão arterial decorrente da estimulação elétrica de fibras pré ganglionares do nervo vago, em cães anestesiados, foi bloqueada pelo TDBr em doses de 10 mg/kg. Ver Fig. 4.

ATIVIDADE BLOQUEADORA NEUROMUSCULAR DO TDBr

Em cães anestesiados.

O TDBr, em doses de 10 a 15 mg/kg, em cães anestesiados, bloqueou de maneira parcial ou completa as contrações do músculo tibial anterior decorrentes de estímulo elétrico do nervo ciático popliteo externo. As Figs. 5 e 6 mostram aspectos destes bloqueios e do antagonismo com nitrato de uranila, neotigmina e cloreto de cálcio.

Em ratos anestesiados.

Doses de 10 a 20 mg/kg de peso, do TDBr, bloquearam em ratos anestesiados, a junção neuromuscular. Houve entretanto grande variação na intensidade e duração dos bloqueios, nesta espécie animal. As contrações musculares decorrentes de estímulo direto não foram influenciadas pelo TDBr. As tentativas de antagonismo com a uranila, cálcio e bicarbonato não revelaram nítida eficácia. Ver Fig. 7.

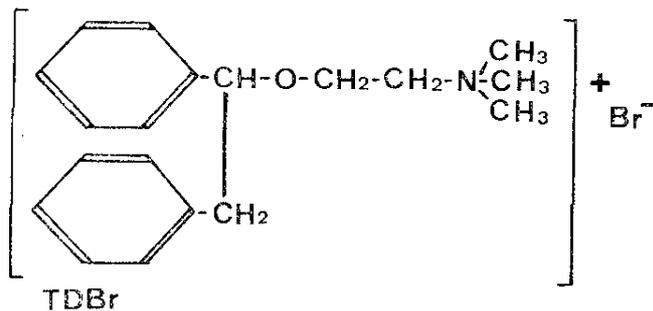
Em pintos despertos.

O TDBr, em doses de 25 a 30 mg/kg, apresentou bloqueio neuromuscular de intensidade e duração variáveis, em pintos despertos. As características posturais das aves durante os bloqueios estão apresentadas na Fig. 8, em estudo comparativo com a succinilcolina e a galamina.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O TDBr apresenta como grupamento terminal em cadeia alifática, um amonio quaternário com três radicais metílicos. Esta parte de sua estrutura química constitui uma cabeça catiônica igual à dos ésteres da colina nos quais representa grupamento farmacodinâmico importante. A benzilcolina por outro lado com estrutura geral muito aproximada à da do TDBr, tem atividade em receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos (5). A presença do grupamento trimetil amonio terminal na estrutura do TDBr sugeria a atividade desta subs-

tância sobre receptores colinérgicos e com grande probabilidade, com características estimulantes. Entretanto os resultados obtidos nestas experiências revelaram sempre atividade inibitória, que se pode responsabilizar em parte à porção aromática da estrutura do TDBr.



brometo de trimetil-(1,2-difeniletoxi)etil-amoneo

Outro aspecto interessante de seu comportamento farmacológico foi a fraca atividade atropínica apresentada, porém com potente ação espasmolítica, revelada no íleo de cobaia e útero de rata (3), mostrando ainda antagonismo à histamina e à 5-hidroxi-triptamina.

Com referência às ações bloqueadoras ganglionar autonômica e neuromuscular, o TDBr apresentou maior potência em relação aos ganglios. Os cães apresentaram maior sensibilidade a estas ações ao passo que os ratos e pintos foram relativamente mais resistentes, ao bloqueio neuromuscular, que se apresentou na maioria das vezes com pouca duração, dificultando ajuizar-se o comportamento antagônico apresentado pela uranila, bicarbonato e cálcio ou neostigmina. As tentativas de antagonismo com os cátions foram feitas porque o TDBr além de ter certa semelhança estrutural com detergentes empregados na precipitação de polissacarídeos, apresenta ação diminuidora da tensão superficial. Como Zingier (8) ao descrever a atividade bloqueadora neuromuscular das polimixinas atribuiu este comportamento à propriedade tensioativa das mesmas e obteve antagonismo satisfatório com o emprego da uranila e do bicarbonato associado ao cálcio, também em algumas experiências com o TDBr os referidos cátions foram utilizados. Os resultados atuais entretanto não puderam confirmar um mecanismo de ação detergente catiônica para os bloqueios apresentados pelo TDBr, uma vez que houve grande variação no que se refere ao antagonismo pelos cátions. Por outro lado, em algumas experiências, a neostigmina e o cloreto de

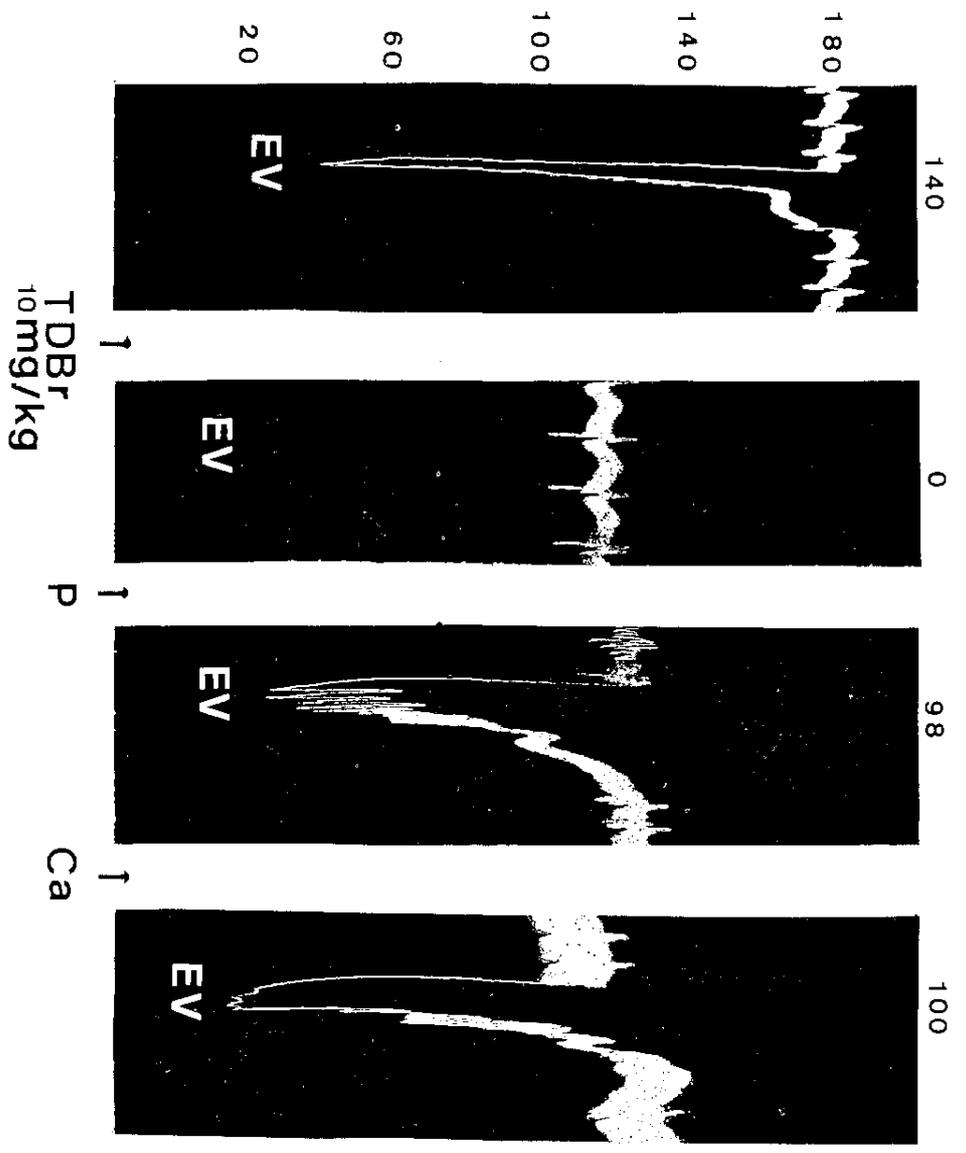


Fig. 4. Registro da pressão arterial carotídea em cão anestasiado. EV: estímulo elétrico do nervo vago direito, durante 10 segundos. P: neostigmina, 100 ug/kg. Ca: cloro de cálcio, 50 mg/kg.

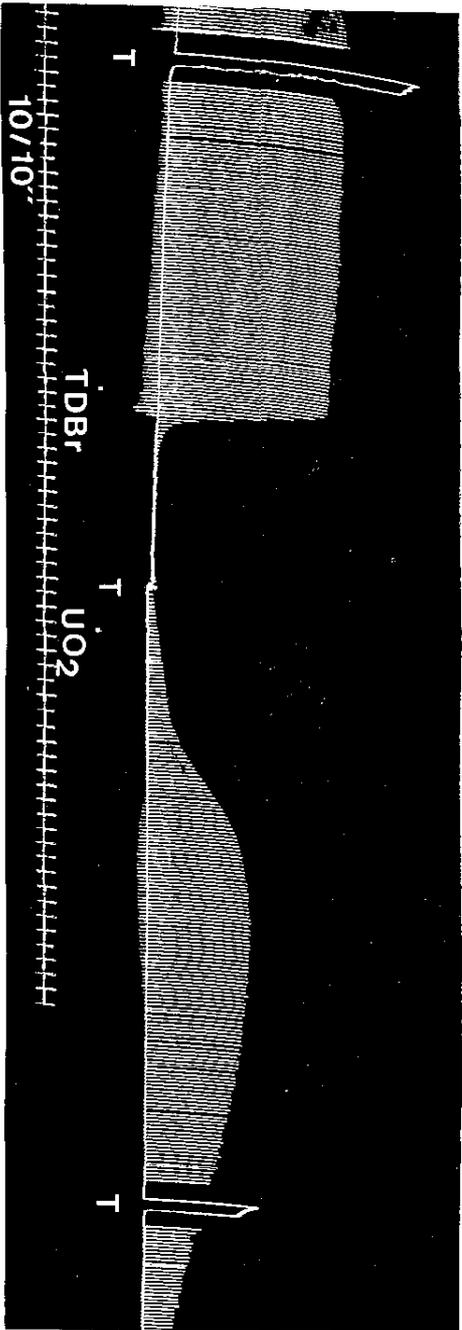


Fig. 5. Preparação neuromuscular (côfimo poplíteo externo-tibial anterior) em cão anestesiado. Em T: estímulo com frequência tetanizante. TDBr: 10 mg/kg. UC2: nitrato de uranida, 60 mg/kg.

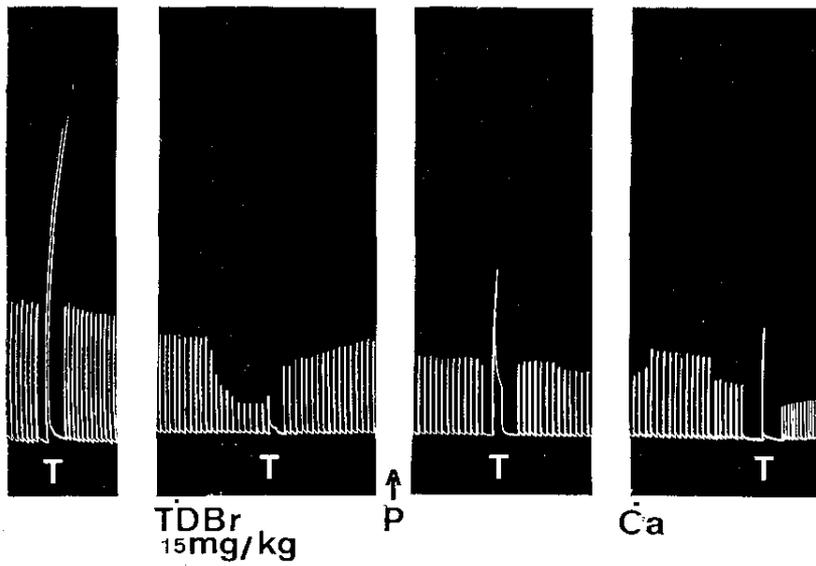


Fig. 6. Preparação neuromuscular (ciático popliteo externo-tibial anterior) em cão anestesiado. Em T: estímulos com frequência tetanizante. P: neostigmina, 100 ug/kg.. Ca: cloreto de cálcio, 50 mg/kg.

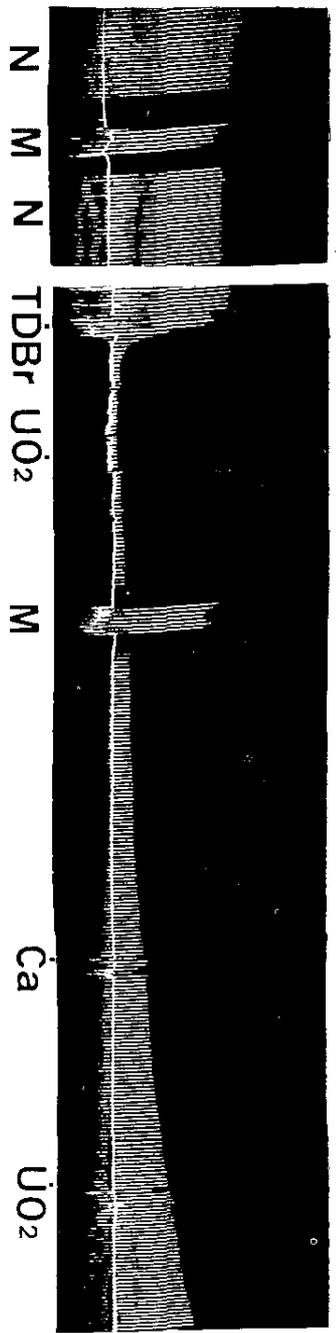
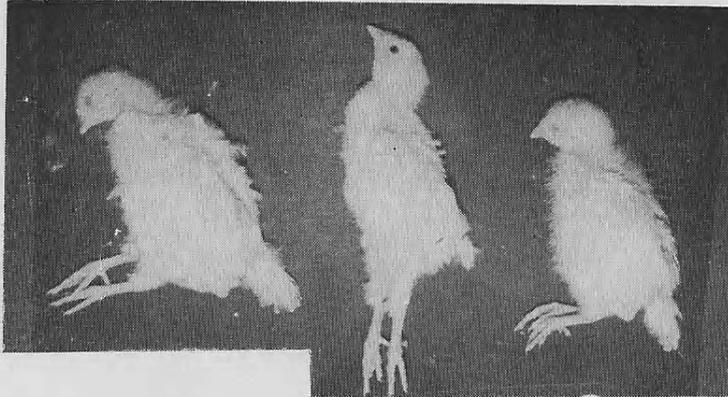


Fig. 7. Preparação neuromuscular (cáptico-gastrocnémio) em rato anestesiado. Em n: estímulos indiretos. m: estímulos diretos. UO₂: nitrato de urânio, 40 mg/Kg. Ca: cloreto de cálcio, 50 mg/Kg.



T

S

G

Fig. 8. Pintos de um mês. Comportamento postural durante curarização. T: TDBr. S: succinilcolina. G: galamina.

cálcio apresentaram melhor efeito antagonico que os obtidos com a uranila ou bicarbonato de sódio em associação com cloreto de cálcio. A potenciação das ações da polimixina B, determinada por anticolinesterases Corbett et alli (1), não foi observada com relação ao TDBr.

A inibição de Wedenski e a facilitação pós tetânica foram ocorrências inconstantes nas várias experiências com cães e ratos, sendo porém a facilitação observada com maior freqüência e a inibição aparecendo mais após a aplicação do cálcio como antagonista.

Estes aspectos aliados ao comportamento dos bloqueios neuromusculares em pintos, sugerem um mecanismo de ação competitivo com a acetilcolina em receptores muscarínicos e nicotínicos das sinapses ganglionares autonômicas e neuromusculares.

Outros aspectos farmacológicos do TDBr estão sendo estudados em músculo liso intestinal e uterino onde esta substância vem se revelando prodigamente ativa e talvez se possa obter melhores conhecimentos sobre seu mecanismo de ação.

Conclusões

O TDBr (brometo de trimetil-(1,2-difeniletioxi)etil)-amônio, apresentou, em cães anestesiados, ação bloqueadora de receptores muscarínicos e nicotínicos em sinapses ganglionares autonômicas.

No íleo isolado de cobaia, igualmente bloqueou receptores do tipo nicotínico em ganglios autonômicos parassimpáticos.

As respostas decorrentes de estimulação nervosa pré ganglionar foram inibidas pelo TDBr, revelando bloqueio da transmissão sináptica ganglionar.

Em cães e ratos anestesiados bem como em pintos despertos, o TDBr, bloqueou a junção neuromuscular com características sugestivas de mecanismo de ação competitivo ou estabilizador.

Resumo

O TDBr (Brometo de trimetil-(1,2-difeniletioxi)etil)-amônio em doses de 10 a 30 mg/kg, bloqueou sinapses ganglionares autonômicas e neuromusculares de animais de laboratório. O autor comenta o provável mecanismo destas ações.

Palavras chaves: TDBr — Brometo de trimetilamônio — Bloqueio ganglionar e neuromuscular .

Summary

Doses of 10 — 30 mg/kg of TDBr (Trimethyl-(1,2-diphenylethoxyethyl)-ammonium bromide), blocked the ganglionic and neuromuscular sinapsis of laboratorial animals. The author discusses the probable mechanism of those actions.

Key words: TDBr — Trimethylammonium bromide — Ganglionic and neuromuscular blockade.

Résumé

Les doses de 10 — 30 mg/kg du TDBr (Bromure de triméthyl-(1,2-diphényléthoxyéthyl)-ammunium, ont bloqués les sinapsis ganglionaires et neuromusculaires chez les animaux de laboratoire. L'auteur commente le possible mécanisme de ces actions.

Mots clés: TDBr — Bromure de triméthylammunium — Blockage ganglionaire et neuromusculaire.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — CORBETT, C. E.; RAMOS, A. O.; RAMOS L., CUNHA, M. A. — Efeitos da polimixina B nos receptores colinérgicos dos gânglios autonômicos e dos efetua-dores parassimpáticos. *Cienc. e Cult.*, São Paulo, 17(2): 264, 1965.
- 2 — FELDBERG, W — Effects of ganglion-blocking substances on the small intestine. *J. Physiol.*, Londres, 113(4): 483-505, 1951.
- 3 — FORTES, V. A., Observações não publicadas, 1972.
- 4 — GHIDINI, G. — Expérimentation clinique préliminaire d'un nouvel antitussif: Bro-mure de triméthyl (1,2-diphényl-éthoxyéthyl) ammonium. *Gior. clin. med. Bolonha* 37 (11): 1665 — 1668, 1956.
- 5 — GILL, E. W. & RANG, H. P. — An alkylating derivative of benzilycholine with specific and long lasting parasympatholytic activity. *Mol. Pharmacol.* New York, 2: 248-297, 1966.
- 6 — PLISNIER, H. — *Studio comparativo dell'azione dei derivati dell'oppio e delle diverse sostanze. sul broncospasmo e sulla secrezione bronchiale.* Tese, Bruxelas 1957.
- 7 — ROSZKOWSKI, A. P. — An unusual type of sympathetic ganglionic stimulant. *J. Pharmac. exp. Ther.*, Baltimore, 122(2): 156-170, 1961.
- 8 — ZINGIER, S. B. — Contribuição para o estudo da atividade das polimixinas A e B (Colistina) na junção neuromuscular. *Rev. Fac. Farm. Bioquim.*, São Paulo, 4(2): 271-309, 1966.