

PADRONIZAÇÃO DA PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGOS PARA UTILIZAÇÃO EM PESQUISAS EM TRANSMISSÕES NEUROMUSCULARES

Mylena Maria Delgado Iurk (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Lilian Martins Castellão Santana (doutoranda PBC), Wilson Alves-do-Prado (DFT), Celia Regina Ambiel (Orientadora), e-mail: mylenaadelgado@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências
Biológicas/Departamento de Ciências Fisiológicas/Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas e Subárea: Fisiologia

Palavras-chave: transmissão neuromuscular, neuromodulação, camundongo.

Resumo:

O nosso grupo de pesquisa do laboratório de estudo farmacológico das transmissões periféricas da UEM estuda o processo de neuromodulação pré-sináptica da liberação de acetilcolina pelo neurônio motor há pelo menos 20 anos, usando rato como animal experimental. O objetivo deste projeto foi padronizar o modelo de preparação nervo frênico-diafragma isolado em camundongos para estudos de neuromodulação pré-sináptica, por meio de registros miográficos, uma vez que os custos com animal e fármacos são menores. As preparações neuromusculares de camundongo se apresentaram muito estáveis nos experimentos com baixa (0,2 e 5Hz) e/ou alta frequências (50Hz) de estimulação. As concentrações dos antagonistas dos receptores: nicotínico neuronal e muscarínicos, subtipos M_1 e M_2 , utilizadas nos experimentos com ratos também não induziram nenhuma alteração significativa nas respostas contráteis em camundongos, porém foram capazes impedir (hexametônio) ou acentuar (metocramina) o efeito da neostigmina, em concordância com os resultados encontrados em ratos. Assim, concluímos que o laboratório está em condições de fazer seus estudos neuromusculares utilizando também a preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongos, uma vez que encontram-se já padronizadas as curvas controles para os experimentos de baixa (0,2 e 5Hz) e alta (50Hz) frequências de estimulação, além das curvas controles com os antagonistas: nicotínico neuronal, muscarínico M_1 e muscarínico M_2 .

Introdução (Arial 12, Negrito, alinhado à esquerda)

A acetilcolina (ACh) liberada do neurônio motor ativa receptores pós-sinápticos da placa motora, mas também pode ativar receptores muscarínicos (M_1 e M_2) e nicotínicos neurais (Nn) do terminal de onde foi liberada, processo chamado de autorregulação (ALVES-DO-PRADO, 2015). Nosso grupo de pesquisa vem estudando todo esse processo regulação pré-sináptica da liberação de ACh pelo neurônio motor há pelo menos 20 anos, usando principalmente preparações neuromusculares de ratos. Entretanto,

vários grupos de pesquisa fazem uso de preparações neuromusculares de camundongos, e os resultados obtidos com essas duas espécies de animais são, geralmente, concordantes. A grande vantagem da utilização de camundongos refere-se principalmente à economia de fármacos utilizados, já que o tamanho de preparação neuromuscular de camundongo é aproximadamente seis vezes menor que a do rato, além do custo do animal ser menor. Assim, o objetivo deste projeto foi padronizar o modelo de preparação nervo frênico-diafragma isolado em camundongos para estudos de neuromodulação pré-sináptica por meio de registros miográficos.

Materiais e métodos

Essa pesquisa foi aprovada de CEUA-UEM (nº 6208050917). Camundongos Swiss (35-40g) sofreram eutanásia (lidocaína-10 mg/kg, seguida por tiopental-120 mg/Kg, i.p.). Em seguida, o hemidiafragma esquerdo, juntamente com o nervo frênico foi isolado e depositado em uma cuba de vidro contendo tampão tyrode (10mL), mantido a $33 \pm 2^\circ\text{C}$ e aerado com mistura carbogênica. Os hemidiafragmas foram conectados, por um fio de algodão, a um transdutor, acoplado a um sistema de aquisição de dados. O nervo frênico recebeu estímulos elétricos por meio de um eletrodo.

Nos experimentos em que foi utilizada apenas a frequência de estimulação de 0,2Hz, após a estabilização da preparação (± 30 minutos), fez-se o registro dos abalos musculares durante 1h. A amplitude das contrações musculares registrada ao final do período foi comparada com aquela inicial (% controle). Nos experimentos em que foram padronizadas as estimulações de 5 ou 50Hz, o nervo frênico foi estimulado com 5 ou 50 Hz (durante 10s) a cada 20 min, por 5 vezes. Nos intervalos entre os trens de estímulo (5 ou 50Hz), o nervo recebeu estímulos de 0,2Hz. A tensão muscular registrada ao final (B) do trem de estímulos (5 ou 50Hz) foi comparada com aquela obtida no início da estimulação (A), por meio da razão B/A. A razão B/A obtida à cada estimulação foi comparada com a primeira estimulação (controle).

Os antagonistas dos receptores: Nn (hexametônio, 120 μM), M₁ (pirenzepina, 10nM) e M₂ (metoctramina, 0,1 μM) foram administrados diretamente na cuba de contenção, 15 min após o tétano (50Hz) controle. As concentrações dos antagonistas utilizadas foram as mesmas usadas em experimentos com ratos. Os resultados obtidos com a administração dos diferentes fármacos foram comparados com experimentos controles (livre de drogas), por meio do teste *t* de Student ($P < 0.05$). Uma vez que hexametônio e metoctramina não provocaram alterações significativas na razão B/A (figura 1B) ou na tensão tetânica inicial (como foi o caso da pirenzepina), foram feitos experimentos associando hexametônio ou metoctramina com o anticolinesterásico neostigmina (0,15 μM) para confirmar se, de fato, estavam exercendo sua ação antagonista sobre seus seletivos receptores, uma vez que o efeito dos mesmos sobre a ação da neostigmina já foi descrito por nosso grupo em preparações neuromusculares de ratos (DE PAULA RAMOS et al., 2014). Os resultados obtidos com as associações foram individualmente comparados (teste *t* de Student, $p < 0,05$) com neostigmina isoladamente.

Resultados e Discussão

Nos experimentos em que as preparações receberam estímulos neurais com frequência de 0.2Hz, as contrações musculares se mantiveram estáveis, apresentando a mesma amplitude do início ($t=0\text{min}$) até o término ($t=60\text{min}$) do período de registro. De forma semelhante, quando foram aplicados estímulos de 5 ou 50Hz, foram observadas apenas oscilações muito discretas na razão B/A (figura 1A) ao longo dos 5 estímulos, que não ultrapassaram o percentual de $\pm 5\%$ quando comparadas com a razão controle, sendo consideradas oscilações normais das respostas contráteis.

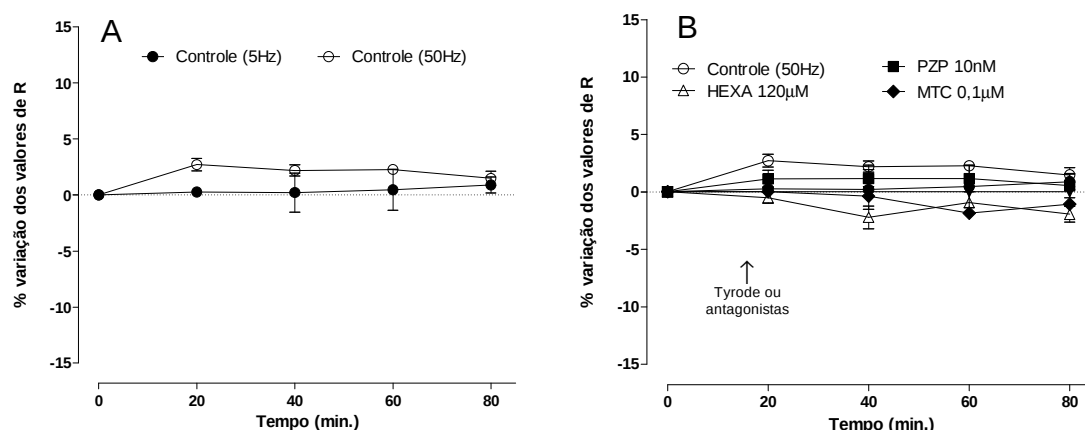


Figura 1: Ausência de variação significativa da razão ($R=B/A$) em preparações nervo frênico-diafragma isolado de camundongos submetidas a estímulos neurais de 5Hz (A) ou 50Hz (A e B) durante 10s. A - experimentos controle (livre de drogas) e B na ausência ou presença do antagonista nicotínico neuronal (hexametônio – HEXA, 120 µM), do antagonista muscarínico M_1 (pirenzepina - PZP, 10nM) ou do antagonista muscarínico M_2 (metoctramina – MTC, 0,1 µM). Resultados não foram diferentes do controle ($p>0,05$, teste t Student, $n=3-5$).

Nos experimentos em que foram investigadas as ações do hexametônio, da pirenzepina e da metoctramina, não foram observadas diferenças significativas na razão B/A (figura 1B). Tais resultados estão em concordância com aqueles encontrados em preparações neuromusculares de ratos (BORNIA et al., 2009). Adicionalmente, hexametônio foi capaz de bloquear completamente a redução da $R=B/A$ induzida por neostigmina (figura 2A), enquanto que metoctramina apresentou uma tendência a acentuar (figura 2B) a redução da $R=B/A$ induzida pelo anticolinesterásico. Esses resultados se assemelham àqueles encontrados em preparações de ratos (DE PAULA RAMOS et al., 2014) e, portanto, confirmam que hexametônio e metoctramina estão apresentando seus efeitos antagonistas sobre seus respectivos receptores Nn e M_2 . Os motivos que fazem com que esses antagonistas interfiram nos efeitos da neostigmina fogem do escopo deste trabalho e podem ser observados no estudos de DE PAULA RAMOS et al. (2014).

Adicionalmente, foi observado que pirenzepina também ocasionou uma redução significativa nos valores de A, na ordem de $-10,09\pm 2,96\%$ ($n=3$,

dados não mostrados), resultado este que também foi encontrado em experimentos com ratos (queda do valor de A de $12.5 \pm 0.1\%$, $n=4$, BORNIA et al., 2009), deixando claro o seu efeito antagonista seletivo sobre receptores muscarínicos M_1 .

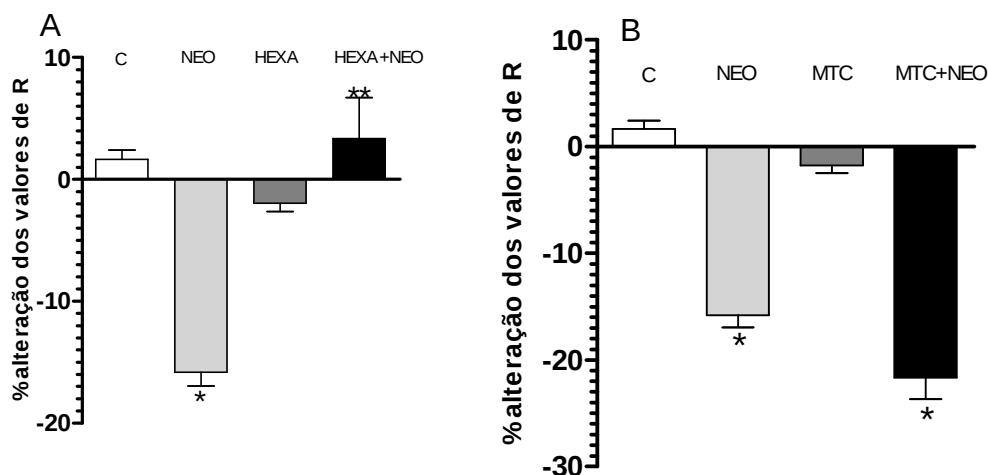


Figura 2: Efeito do hexametônio (HEXA, $120\mu\text{M}$ - A) e da metoclopramina (MTC $0,1\mu\text{M}$ - B) na porcentagem (%) de redução nos valores de R induzido por neostigmina (NEO, $0,15\mu\text{M}$) em preparações nervo frênico-diafragma isolado de camundongos indiretamente estimuladas com frequência de 50Hz. Altura das colunas indica média $\pm$ EPM. * valores diferentes ($P<0,05$) do controle (C; Tyrode livre de drogas,) (teste t Student, $n=5$) ** valores diferentes ($P<0,05$) da NEO separadamente (teste t Student, $n=3-5$).

Conclusões

O laboratório de neurofarmacologia das transmissões periféricas está apto a fazer seus estudos neuromusculares utilizando também a preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongos, uma vez que encontram-se já padronizadas as curvas controles para os experimentos de baixa ($0,2$ e 5Hz) e alta (50Hz) frequências de estimulação, além das curvas controles com os antagonistas nicotínico neuronal, muscarínico M_1 e muscarínio M_2 .

Agradecimentos: à UEM e à Fundação Araucária.

Referências

ALVES-DO-PRADO, W. **Farmacologia das Neurotransmissões Colinérgicas Periféricas**, 2ª edição, Maringá: EDUEM, 2015, 79p.

DE PAULA RAMOS, E; ANTÔNIO, M. B.; AMBIEL, C. R.; CORREIA-DE-SÁ, P.; ALVES-DO-PRADO, W. Paradoxical neostigmine-induced TOF fade: On the role of presynaptic cholinergic and adenosine receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 723, p. 389-396, 2014.

BORNIA, E. C. S.; BANDO, E.; MACHINSKI JR, M.; PEREIRA, M. W.; ALVES-DO-PRADO, W. Presynaptic M_1 , M_2 , and A_1 receptors play roles in tetanic fade induced by pancuronium or cisatracurium. **Journal of Anesthesiology**, v. 23, p. 513-519, 2009.