OS EFEITOS DA NEOSTIGMINA E DO BW284c51 NA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR DE CAMUNDONGOS ESTÃO RELACIONADOS COM O GRAU DE ATIVAÇÃO E DE DESSENSIBILIZAÇÃO DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONAIS.

Renan Soares Rabassi (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lilian Martins Castellão Santana (doutoranda PBC), Wilson Alves-do-Prado (DFT), Celia Regina Ambiel (orientadora).
e-mail: rehrabassi@gmail.com

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

Área: Ciências Biológicas e Subárea: Fisiologia

Palavras-chave: neuromodulação, anticolinesterásicos, fadiga neuromuscular.

Resumo:
Neostigmina (NEO) é usada na anestesiologia para acelerar o processo de reversão do bloqueio neuromuscular induzido por bloqueadores neuromusculares não despolarizantes. Contudo, além de sua atividade anticolinesterásica, NEO também ativa diretamente receptores nicotínicos pré-sinápticos, além de bloquear a butirilcolinesterase. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar, de forma comparativa com um bloqueador seletivo para a acetilcolinesterase (BW284c51 - BW) ou com a própria acetilcolina (ACh), os efeitos da NEO em preparações nervo frênico-diafragma isolado de camundongos, submetidas a estímulos neuronais do tipo TOF. A amplitude da tensão muscular registrada no início (T_1) e ao término de cada TOF (T_4) e a razão entre T_4/T_1(R_{TOF}) na presença de drogas foram comparadas (teste t Student, $p<0.05$) com aquelas obtidas sem drogas. BW induziu aumento mais intenso da amplitude de T_1 do que de T_4, resultando em uma queda da R_{TOF}. Hexametônio (HEXA) reduziu principalmente o aumento de T_4, enquanto que metoctramina (MTC) atenuou, igualmente, o aumento inicial de T_1 e T_4. ACh induziu uma queda de todos os parâmetros analisados, sendo que apenas HEXA foi capaz de atenuar tais efeitos. Já a administração de NEO resultou em um aumento de T_1 e uma redução da amplitude de T_4, ocasionando uma intensa queda da R_{TOF}. HEXA foi capaz de atenuar somente a queda de T_4 e, consequente a redução da R_{TOF}. Tais resultados nos permitem concluir que os efeitos da NEO e do BW na transmissão neuromuscular dependem, dentre outros fatores, do grau de ativação e de dessensibilização dos receptores nicotínicos neuronais.

Introdução

A acetilcolina (ACh) liberada pelo neurônio motor ativa receptores nicotínicos da placa motora, levando à contração muscular, mas também pode se ligar a receptores colinérgicos muscarínicos facilitatórios(M1) ou inibitórios(M2) e nicotínicos neurais facilitatórios(Nn) presentes no terminal nervoso motor, modulando sua própria liberação (ALVES-DO-PRADO, 2015). Outro destino da ACh é sofrer hidrólise pela acetilcolinesterase (AChase) presente na fenda sináptica.

Fármacos inibidores da AChase (principalmente a neostigmina-NEO) são usados na anestesiologia para acelerar o processo de reversão do bloqueio neuromuscular induzido por bloqueadores neuromusculares não despolarizantes. Contudo, tem sido observado que, além de sua atividade anticolinesterásica, a NEO também possui atividade agonista nicotínica e uma capacidade para bloquear a butirilcolinesterase (PAULA-RAMOS et al., 2014). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar, de forma comparativa com a administração de um bloqueador seletivo para a AChase (BW284c51) ou da própria ACh, os efeitos da NEO na transmissão neuromuscular de camundongos, submetida a estímulos neuronais do tipo TOF (*train of four*).

Materiais e métodos

Essa pesquisa foi aprovada de CEUA-UEM (nº4474230718). Camundongos Swiss (35-40g) sofreram eutanásia em câmara com isoflurano. Em seguida, o diafragma esquerdo, juntamente com o nervo frênico foram isolados, depositados em cuba de vidro com solução tyrode (35^{o}C e aerada com mistura carbogênica) e conectados, a um transdutor acoplado a um sistema de aquisição de dados, para registro das contrações musculares.

O nervo frênico recebeu estímulos de 0,2Hz durante 20 min. A seguir, foram aplicados estímulos TOF (2Hz por 2s, a cada 15s) durante 15min, passando novamente a receber estímulos de 0,2Hz durante 20min. Essa sequência foi repetida por 3 vezes: 1ª) livre de drogas (controle); 2ª) com Krebs livre de drogas ou na presença de fármacos antagonistas: nicotínico neuronal (hexametônio, HEXA; 200µM) ou muscarínicos, subtipo M_1 (pirenzepina, PZP; 10nM) ou M_2 (metoctramina, MTC; 0,1µM); 3ª) na ausência ou presença de neostigmina (NEO; 1,0µM), BW284c51(BW; 4µM) ou ACh (5mM). A amplitude da tensão muscular registrada no início (T_1) e ao término de cada TOF (T_4), bem como a razão entre T_4/T_1(R_{TOF}) na presença de drogas foram comparadas com aquelas obtidas na ausência de drogas (% do controle) por meio do teste *t* de Student ($p<0.05$).

Resultados e Discussão

Preparações neuromusculares livres de drogas quando receberam estímulos TOF apresentaram os quatro abalos musculares com a mesma amplitude, resultando em um R_{TOF}=1,0 (t=-60 min nas figuras 1 e 2; A e C). A presença isolada dos fármacos antagonistas (HEXA, MTC ou PZP) não provocou qualquer alteração no perfil do TOF (t=-30 min nas figuras 1 e 2; A e C). Por sua vez, BW (4µM) induziu um expressivo aumento na amplitude de T_1 e T_4 (figura 1; B e D). Entretanto, como o aumento de T_4 não teve a mesma intensidade de T_1, registrou-se uma queda da R_{TOF} (figura 1; A e C). A administração prévia de HEXA reduziu os efeitos de BW em T_4 (figura 1B) de forma mais intensa do que de T_1, determinando uma maior queda de R_{TOF} (figura 1A). MTC atenuou com a mesma intensidade os aumentos iniciais T_1 e T_4 induzidos por BW (figura 2B), não alterando, assim, a % de redução da R_{TOF} (figura 2A). PZP não foi capaz de interferir nos efeitos do BW. Tais resultados sugerem que o aumento da permanência da ACh na fenda sináptica induzido por BW leva à ativação dos receptores facilitatórios Nn, porém, tais receptores logo se dessensibilizam, ocasionando um menor aumento de T4 e a queda da R_{TOF}. A

inibição do receptor inibitório M_2 por MTC leva a uma maior dessensibilização de Nn, induzindo uma atenuação no aumento de T_1 e T_4.

Por outro lado, a administração de uma alta concentração de ACh (5mM) induziu uma queda de todos os parâmetros analisados (figura 2; A e B). Somente a administração prévia de HEXA (figura 2; A e B) foi capaz de atenuar os efeitos da ACh, apontando ser provavelmente uma intensa dessensibilização dos receptores nicotínicos pré-sinápticos a principal causa dos efeitos inibitórios da ACh.

Por sua vez, a administração de NEO (1µM) induziu um intenso aumento (~100%) da amplitude de T_1, enquanto que a amplitude de T_4 sofreu uma redução de ~25% (figura 2D), resultando em uma expressiva queda da R_{TOF} (figura 2C). A administração prévia de HEXA foi capaz de atenuar apenas a queda de T_4 e, consequentemente, a redução da R_{TOF}. MTC ou PZP não foram capazes de interferir nos efeitos NEO. Tal resultado provavelmente resulta da ação direta e indireta da NEO sobre os receptores Nn, induzindo uma intensa ativação dos mesmos, seguida, porém, de uma rápida dessensibilização, que se traduz no registro miográfico em uma redução de T_4 (figura 2D).

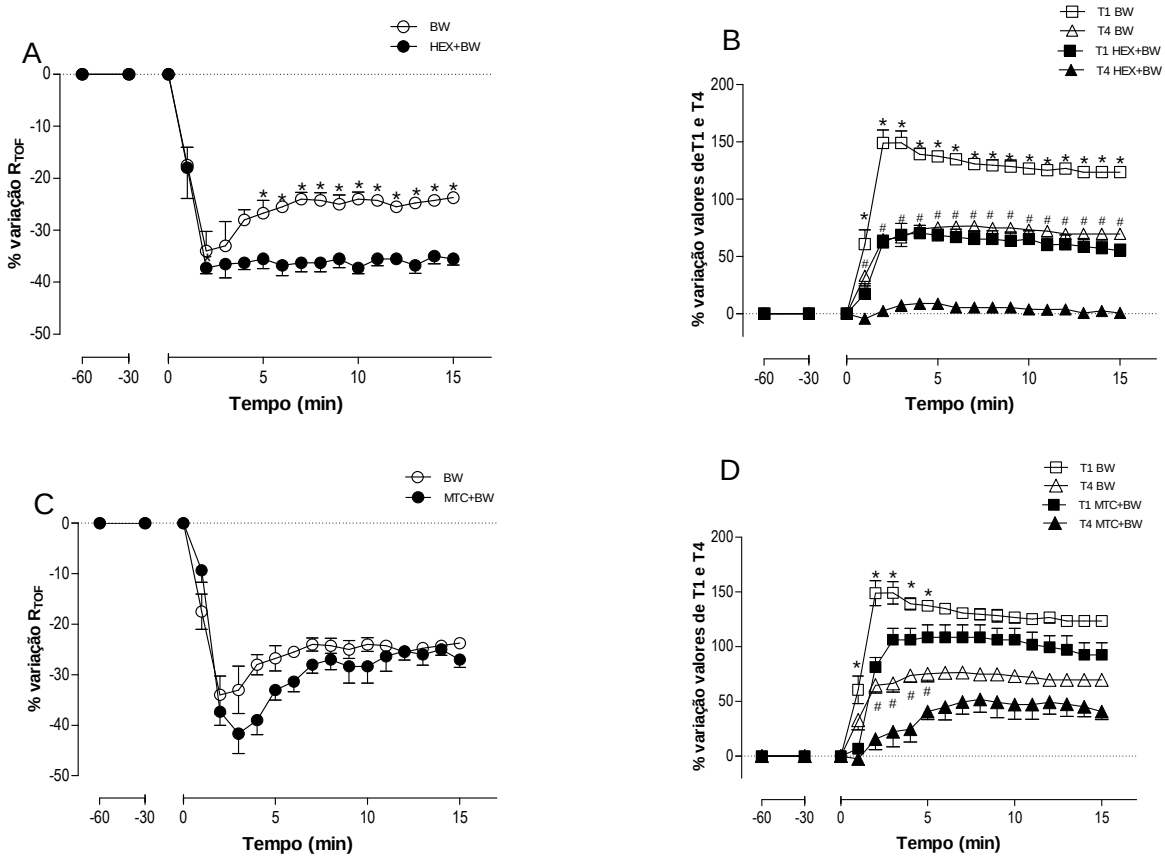

Figura 1. A- Porcentagem de redução dos valores da razão do TOF (R_{TOF}; A e C) causada por BW284c51 (BW; 4 µM) isolado ou após a administração prévia de hexametônio (HEXA; 200µM; A) ou metoctramina (MTC; 0,1µM; B) em preparações nervo frênico-diafragma isolado estimuladas indiretamente com estímulos TOF. As porcentagens de variação da amplitude de T_1 e T_4 do TOF produzidas por BW isolado ou com a administração prévia de HEXA ou MTC também são mostradas na figura B e D. Os dados são expressos como média±EPM (n=4). *diferente da R_{TOF}(A) ou da amplitude de T_1(B e D) obtida com a associação HEXA+BW. $^{\#}$diferente da amplitude de T_4 (B e D) obtida com a associação HEXA+BW. Teste *t* de Student, p<0,05.

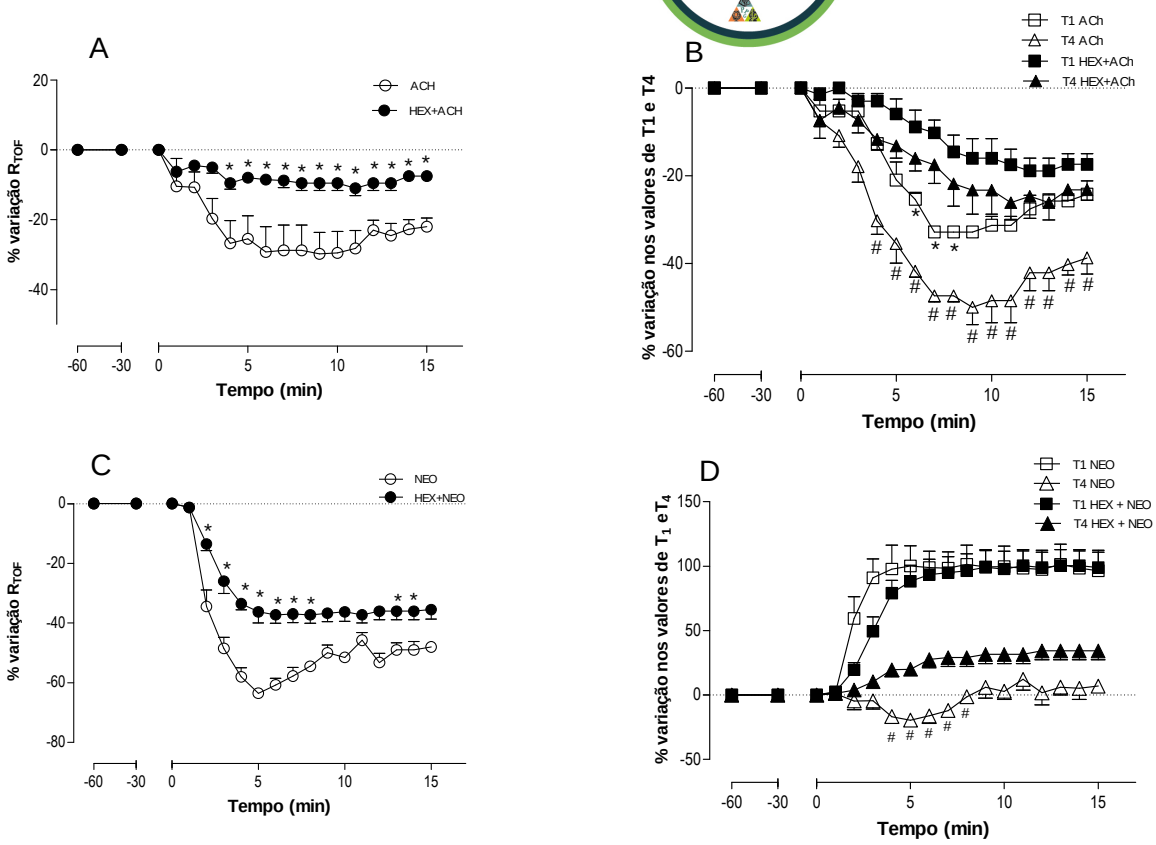

Figura 2. A- Porcentagem de redução dos valores da razão do TOF (R_{TOF}; A e C) causada por acetilcolina (ACh; 4,0µM, A) ou neostigmina (NEO; 1,0µM, C) isoladas ou após a administração prévia de hexametônio (HEXA; 200µM; A e C) em preparações nervo frênico-diafragma isolado estimuladas indiretamente com estímulos TOF. As porcentagens de variação da amplitude de T_1 e T_4 do TOF produzidas por ACh ou NEO isolados ou com a administração prévia de HEXA também são mostradas na figura B e D. Os dados são expressos como média±EPM (n=4). *diferente da R_{TOF}(A) ou da amplitude de T_1(B) obtida com a associação HEXA+ACh ou HEXA+NEO. #diferente da amplitude de T_4 (B e D) obtida com a associação HEXA+ACh ou HEXA+NEO. Teste *t* de Student, p<0,05.

Conclusões

Tomados os resultados em conjunto, é possível concluir que os efeitos da NEO e do BW na transmissão neuromuscular dependem, dentre outros fatores, do grau de ativação e de dessensibilização dos receptores nicotínicos neuronais.

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.