



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

FERNANDA CALIXTO BRANDÃO

Métodos de Estudo da Transmissão Neuromuscular

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Gallacci

Instituto de Biociências

UNESP – Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Brandão, Fernanda Calixto.

Métodos de estudo da transmissão neuromuscular / Fernanda Calixto Brandão.
- Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física médica) - Instituto de
Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Márcia Gallacci

Capes: 20903006

1. Física Médica. 2. Transmissão neuromuscular - Efeito das drogas. 3. Junção
neuromuscular. 4. Farmacologia.

Palavras-chave: Biopotenciais; Eletrofisiologia; Junção neuromuscular; Miografia.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar sempre pelo caminho certo, me dar força e saúde; por me iluminar e fazer com que eu acredite no meu potencial para conseguir concluir esta etapa importante na minha vida: concluir este curso.

Ao meu pai pela alegria transmitida, por ser minha inspiração de um grande trabalhador, por acreditar que tudo vai dar certo e por me transmitir segurança. À minha mãe pela cobrança, apoio, pela presença nas horas boas e ruins, pelo exemplo de uma grande mãe, sempre muito rígida e ao mesmo tempo carinhosa! Pai e mãe, muito obrigada por tudo!

À minha irmã pela amizade, companheirismo, ajudas, conselhos, por ser meu exemplo de responsabilidade. Ao meu irmão pela torcida, humildade e felicidade transmitida.

Ao meu namorado, Paulo, pela dedicação, palavras confortantes, momentos de descontração, pela alegria de estarmos juntos e pelo apoio nas minhas decisões. Aos meus amigos que me escutam e dão conselhos, por poder contar nos momentos alegres e tristes, por me fazer feliz! E muito obrigada também ao pessoal da minha turma de faculdade pela boa convivência durante estes anos, pela troca de conhecimento, pelas ajudas nos estudos e pelos momentos de diversão.

Agradeço também, a esta instituição de ensino – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, por possibilitar minha formação acadêmica, através da disponibilização da infra-estrutura (salas de aula, anfiteatros, laboratórios, equipamentos), da contratação de funcionários e, principalmente, pela formação do corpo docente.

A todos os professores que proporcionaram meu crescimento intelectual. Em especial, gostaria de mencionar minha orientadora Professora Dra. Márcia Gallacci, que

por ser um modelo de sucesso profissional, me incentivou a concretizar este trabalho dentro da faculdade. Também agradeço ao pessoal do laboratório onde foi realizado o estágio, Cecília, Fábio, Walter e Carlos por me ensinar, acompanhar, ajudar na realização dos experimentos; pelas conversas e momentos engraçados, pelo apoio....Muito obrigada!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura molecular do receptor colinérgico nicotínico.....	9
Figura 2 (A e B): Representação diagramática da unidade motora e da placa motora..	9
Figura 3: Ponte de Wheatstone.....	12
Figura 4: Sistema de registro miográfico para contrações indiretas.....	13
Figura 5: Sistema de registro miográfico para contrações diretas.....	14
Figura 6: Registro miográfico de contrações musculares em função da frequência de estimulação. A) Contrações musculares isoladas sucessivas. B) Somação temporal de contrações musculares isoladas. C) Contração tetânica incompleta. D) Contração tetânica completa.....	15
Figura 7: Representação esquemática de uma aparelhagem utilizada em registros eletrofisiológicos.....	17
Figura 8 (A e B): Influência da Tc sobre a atividade da BthTX-I nas contrações musculares evocadas indiretamente em preparações frênico-diafragma de camundongos. A ordenada representa a % da amplitude das contrações musculares em relação à amplitude inicial. A abscissa indica o tempo (min) após a adição da toxina ou da mistura da toxina mais extrato de Tc pré-incubadas. Os pontos são a média \pm S.E.M. de 1-9 experimentos. * e # indica, respectivamente, o ponto em que a diferença da BthTX-I e Tc em relação ao controle se tornam significativos. + indica o ponto em que diferenças entre a BthTX-I + Tc em relação a BthTX-I se tornam significantes ($P < 0,05$).....	23

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Resumo</i>	6
1. Introdução	7
1.1 Aspectos Morfológicos da JNM	8
1.2 Aspectos Fisiológicos da JNM	10
1.2.1 Liberação de Ach	10
1.2.2 Transmissão Neuromuscular	10
2. Métodos de Estudo da Transmissão Neuromuscular	11
2.1 Técnica Miográfica	11
2.1.1 Técnica Miográfica <i>in vitro</i>	11
2.2 Técnica Eletrofisiológica <i>in vitro</i>	15
3. Projeto de Iniciação Científica	19
3.1 Introdução	19
3.2 Objetivos	20
3.3 Material e Métodos	21
3.4 Resultados Preliminares e Discussão	22
4. Bibliografia	24

Resumo

Este trabalho tem como objetivo documentar as atividades realizadas no Estágio Curricular Obrigatório do curso de Graduação em Física Médica, realizado no Laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

O estágio englobou atividades relacionadas à Instrumentação e à Iniciação Científica, ambas visando ao estudo da Farmacologia da Transmissão Neuromuscular. Desta forma, neste relatório serão apresentados, inicialmente, uma breve revisão dos aspectos fundamentais da morfologia e da fisiologia da junção neuromuscular. Posteriormente, serão descritos os métodos de estudo da transmissão neuromuscular aprendidos no decorrer do estágio, especificamente, as técnicas miográfica, que permite o registro da contração muscular, e eletrofisiológica, que possibilita o registro de atividade elétrica celular, ambas *in vitro*. Finalizando, serão apresentados os resultados do Projeto de Iniciação Científica desenvolvido, cujo objetivo foi estudar a ação do extrato etanólico da planta *Tabernaemontana catharinensis* sobre o bloqueio neuromuscular induzido por toxinas ofídicas na preparação do nervo frênico-músculo diafragma isolado de camundongos.

Palavras-chaves: Transmissão Neuromuscular, Técnica Miográfica, Técnica Eletrofisiológica, Veneno Ofídico, Planta Antiofídica.

1. Introdução

Sinapse é o local onde a informação é transmitida de uma célula nervosa à qualquer outra estrutura, seja esta nervo, músculo ou glândula. Existem dois tipos de sinapses, as elétricas, nas quais as células excitáveis se comunicam pela passagem direta de corrente elétrica, e as químicas, onde a informação é transmitida pela liberação de um composto químico⁽¹⁾. As sinapses entre os axônios dos neurônios motores e as fibras musculares esqueléticas são chamadas de junções neuromusculares (JNM). Estas servem como modelo de sinapse química, e a substância transmissora é a acetilcolina (Ach)⁽²⁾.

O processo de transmissão que ocorre na JNM, denominado transmissão neuromuscular (TNM), possui grande relevância para a manutenção da vida, pois sua função é transmitir o impulso nervoso para a fibra muscular esquelética, iniciando o processo de contração da musculatura. Em condições fisiológicas normais, a contração muscular possibilita a execução de movimentos envolvidos na manutenção da postura, respiração, fala, e outras atividades voluntárias necessárias para a sobrevivência. O processo de TNM pode ser afetado por diversos fatores como a ação de drogas e toxinas, pelo desenvolvimento de patologias e pela intensidade da atividade física. Desta maneira, é importante que se disponha de métodos que permitam o estudo do funcionamento da JNM.

O estágio teve por objetivos o aprendizado e o treinamento de técnicas utilizadas no estudo do processo de TNM. Sendo assim, envolveu aspectos da área biológica, desde a manipulação e a dissecação de animais experimentais, até conceitos básicos de anatomia, morfologia, fisiologia e farmacologia da junção neuromuscular, bem como aspectos da física básica, relacionada ao funcionamento dos equipamentos, e da biofísica envolvida nos conceitos de biopotenciais elétricos.

Durante o estágio houve uma maior ênfase no aprendizado da técnica de registro miográfico *in vitro*, que é rotineiramente executada no laboratório. Tal fato possibilitou o desenvolvimento de um projeto de iniciação científica ao final do estágio. No decorrer deste houve também o contato com a técnica eletrofisiológica que permite o registro de biopotenciais.

No sentido de facilitar a compreensão das atividades desenvolvidas no estágio, esta monografia será subdividida em 3 grandes tópicos. O primeiro aborda os *Aspectos Morfológicos e Fisiológicos da JNM*, o segundo abrange os *Métodos de Estudo da Transmissão Neuromuscular* e o terceiro expõe um *Projeto de Iniciação Científica*, que envolveu o uso da técnica miográfica para o estudo da transmissão neuromuscular.

1.1 Aspectos Morfológicos da JNM

A unidade funcional do movimento é denominada unidade motora e consiste do motoneurônio e das fibras musculares específicas por ele inervadas (**Figura 2A**). Geralmente, cada fibra muscular recebe inervação de um único motoneurônio, porém, esse pode inervar muitas fibras musculares, devido às numerosas ramificações de suas extremidades. O corpo celular do motoneurônio se localiza no interior da substância cinzenta da medula espinhal, e seu axônio se estende desde a medula até o músculo. Ao se aproximar do músculo, o axônio mielinizado se ramifica, nos nodos de Ranvier, em fibras curtas. Essas, ao atingirem as fibras musculares individualizadas, perdem a bainha de mielina, sofrem posterior ramificação, e, recobertas apenas pelas células da telóglia, fazem sinapses com as fibras musculares, formando a JNM ou placa motora.

A **figura 2B** revela detalhes da ultra-estrutura da JNM. Identifica-se nessa sinapse: 1) a terminação nervosa contendo um grande número de vesículas, que armazenam o neurotransmissor, acetilcolina (Ach); 2) um espaço de aproximadamente 500 Å separando os elementos pré e pós-sinápticos, que constitui a fenda sináptica, e 3) a membrana da fibra muscular (placa motora terminal), cuja área sofre grande aumento pela formação de inúmeras dobras. Nessa membrana encontram-se os receptores colinérgicos nicotínicos, glicoproteínas pentaméricas que formam um canal iônico (**figura 1**). Esses receptores são constituídos por 4 tipos de subunidades denominadas α , β , (γ ou ϵ), e δ , sendo a relação estequiométrica: $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (encontrados em músculos imaturos ou desnervados) ou $\alpha_2\beta\epsilon\delta$ (músculos maduros). Os sítios de ligação para a Ach situam-se sobre as extremidades N-terminais das subunidades α , sendo necessária a ligação de duas moléculas de Ach, uma em cada subunidade, para ativar o receptor, ou seja, abrir o canal.

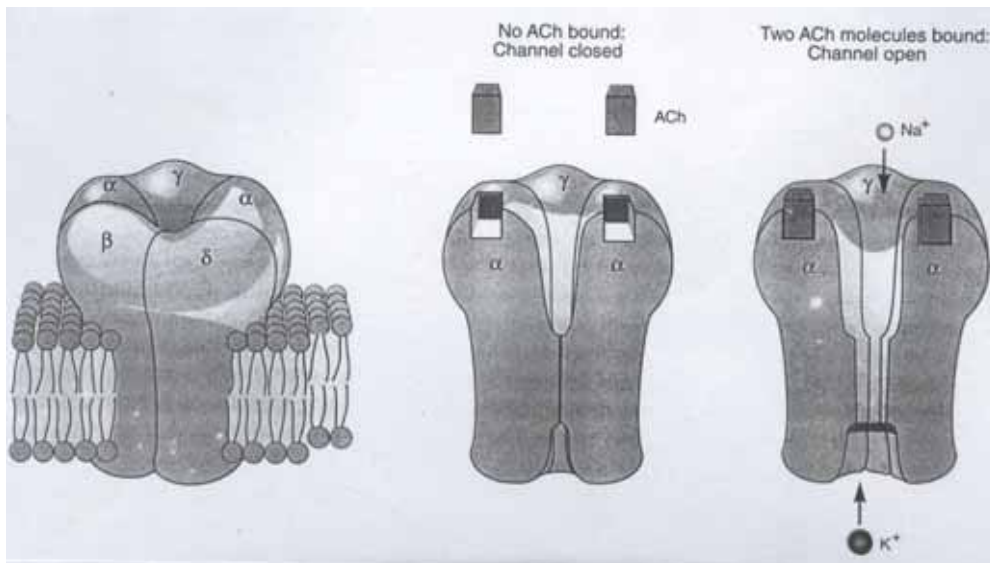


Figura 1: Estrutura molecular do receptor colinérgico nicotínico.

A região da placa motora onde se localizam os receptores nicotínicos é quimicamente excitável, pois depende de um transmissor químico para exercer sua função. Já a região adjacente possui canais de Na^+ e K^+ dependentes de voltagem e, por isso, é dita eletroexcitável. A placa motora representa uma fração extremamente pequena da fibra muscular, ocupando cerca de 0,1 % de sua superfície⁽³⁾.

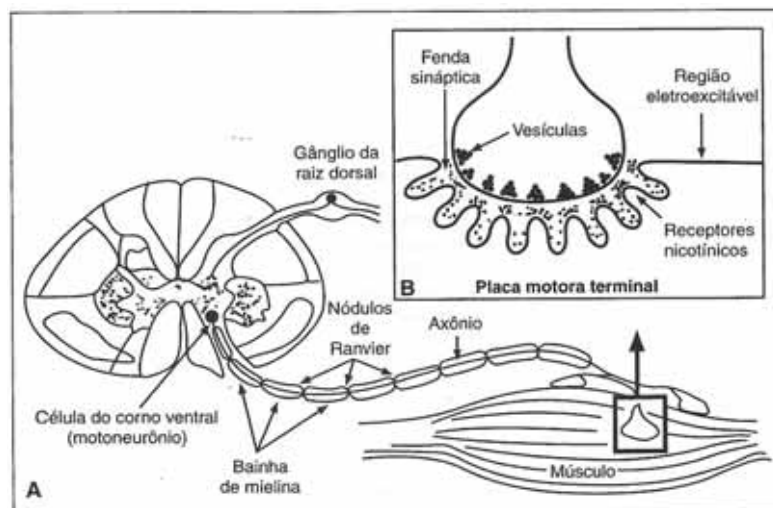


Figura 2 (A e B): Representação diagramática da unidade motora e da placa motora⁽³⁾.

1.2 Aspectos Fisiológicos da JNM

1.2.1 Liberação de Ach

A Ach intravesicular pode ser liberada espontaneamente ou em resposta ao estímulo da terminação nervosa motora. Durante a transmissão neuromuscular, a liberação evocada de Ach dá origem à despolarização local e transitória da região da placa motora terminal, denominada potencial de placa terminal (PPT).

Na década de 1950, Katz *et al.* demonstraram, utilizando técnica de registro intracelular, a ocorrência de pequenas despolarizações (cerca de 0,5mV) da região da placa motora em estado de repouso. Tais despolarizações ocorriam de forma espontânea e aleatória e apresentavam uma forma semelhante ao PPT, sendo, por isso, denominadas de potenciais de placa terminal em miniatura (PsPTm). A observação de que a amplitude dos PPT variava de forma descontínua e que a menor amplitude do PPT coincidia com a amplitude média dos PsPTm levou Katz e sua equipe à hipótese quântica da liberação de mediador, ou seja, a Ach é liberada pela terminação nervosa em quantidades constantes, ou em quanta, sendo assim, um quantum corresponderia ao PPTm. Além disso, foi sugerido que cada quantum de Ach seria delimitado por uma vesícula sináptica e o impulso nervoso teria como função sincronizar a liberação do conteúdo de um determinado número de vesículas de Ach⁽³⁾.

1.2.2 Transmissão Neuromuscular

A transmissão neuromuscular se inicia quando um potencial de ação, conduzido ao longo do axônio motor, despolariza a terminação nervosa sináptica promovendo a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e o influxo deste íon para o seu interior. A concentração aumentada de Ca^{2+} no interior da terminação nervosa faz com que as vesículas sinápticas se fundam com a membrana plasmática, esvaziando seu conteúdo na fenda sináptica, por exocitose. A acetilcolina, então, difunde-se através da fenda sináptica para ligar-se aos receptores colinérgicos nicotínicos, localizados na superfície externa da membrana plasmática da célula muscular, na região da placa motora. A ligação da Ach ao receptor nicotínico aumenta, transitoriamente, a condutância da membrana da placa motora ao Na^+ e ao

K⁺. Correntes iônicas (Na⁺ e K⁺) produzem despolarização transitória da região da placa motora, o potencial de placa terminal (PPT)⁽²⁾. Uma vez que a placa motora é despolarizada, as áreas adjacentes da fibra muscular são despolarizadas pela dispersão das correntes locais e, ao atingirem o limiar, geram potenciais de ação. Embora a placa motora, por si própria, não possa gerar potenciais de ação, ela se despolariza o suficiente para iniciar o processo nas regiões extra-juncionais vizinhas, que são eletroexcitáveis. Assim, potenciais de ação auto-propagáveis são conduzidos ao longo da fibra muscular, liberando cálcio do retículo sarcoplasmático, para dar início ao processo de contração muscular⁽¹⁾.

2. Métodos de Estudo da Transmissão Neuromuscular

2.1 Técnica Miográfica

A técnica miográfica baseia-se no registro de contrações musculares e pode ser realizada em modelos experimentais *in vivo* ou *in vitro*. Experimentos *in vivo* permitem o estudo da farmacocinética e a avaliação dos efeitos sistêmicos dos agentes, porém o uso desses modelos atualmente é limitado por questões éticas. No Laboratório onde foi desenvolvido o Estágio, são realizados mais comumente estudos *in vitro* e o modelo experimental frequentemente utilizado é a preparação do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.

2.1.1 Técnica Miográfica in vitro

O registro miográfico *in vitro* requer o isolamento e a montagem vertical das preparações biológicas em cubas para órgãos isolados contendo solução nutriente adequada, constantemente borbulhada com carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂). Os músculos são conectados, através de seus tendões ou bordos, a um suporte de vidro em forma de “L” e a um *transdutor* de tensão isométrica*. Este último é acoplado a um sistema computacional através de um pré- amplificador.

* **Transdutor** é qualquer dispositivo capaz de transformar um tipo de sinal em outro para permitir o controle de processos físicos, ou realizar uma medição, etc.

Normalmente, os transdutores são utilizados como sensores que indicam o movimento ou força, exercido por outro elemento que estará em contato com o objeto a ser mensurado. Os transdutores resistivos (que funcionam pela variação de resistência de um elemento) são muito utilizados para medir a translação ou o movimento de um corpo. O Strain Gauge, conhecido por extensômetro, é um elemento que altera sua resistência devido a sua própria dilatação ou contração. Este fenômeno é consequência direta da equação que define a resistência de um fio condutor (elemento que liga o transdutor ao objeto mensurado):

$$R = \frac{\rho L}{A}$$

onde, L é o comprimento do fio, ρ é a resistividade do material e A é a área da seção transversal. Logo, podemos notar que se um fio condutor sofre tração longitudinal, sua resistência se altera para mais, à medida que o comprimento aumenta, e a área da seção transversal diminui. Este aumento será significativo, pois a variação de L e A tendem a amplificar a diferença entre a resistência do fio “em repouso” e quando “esticado”. A contração ou compressão do fio, ao contrário, faz com que a resistência diminua. Os resistores podem ser conectados em ponte de Wheatstone (**figura 3**) para melhorar a sensibilidade e aumentar o sinal de saída⁽⁴⁾.

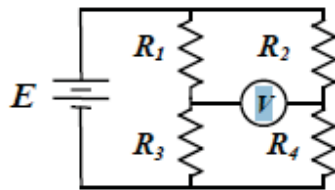


Figura 3: Ponte de Wheatstone⁽⁴⁾.

A medida através deste tipo de transdutor emprega grandeza deslocamento (ou deformação) para modulação do parâmetro elétrico, possibilitando a escolha da grandeza força muscular. É importante lembrar que sistemas que utilizam sensores de deslocamento ou deformação (strain), além da medição de força, são utilizados, mesmo que de forma indireta, para medição de pressão, tensão mecânica, deformação do módulo de Young em tecidos biológicos.

A grandeza força pode ser medida de várias formas. Uma maneira é a medição da deformação produzida em um elemento elástico pela força desconhecida. Uma variedade de dispositivos baseados nesse método é utilizada, principalmente para estudo da atividade muscular.

As propriedades dos músculos são, em geral, estudadas sob uma das seguintes condições: condição isométrica, na qual durante a contração o músculo é mantido com o comprimento constante; condição isotônica, na qual o músculo em contração está sujeito a uma carga constante; condição auxotônica, na qual durante a contração muscular nem a força nem o comprimento se mantêm constantes.

A técnica miográfica *in vitro* permite o estudo do processo de transmissão neuromuscular, através do registro de *contrações musculares indiretas* (evocadas pelo estímulo do nervo motor), bem como do processo contrátil, através do registro de *contrações musculares diretas* (evocadas pela estimulação elétrica do músculo). As **figuras 4 e 5** ilustram o sistema miográfico utilizado para o registro de contrações indiretas e diretas, respectivamente.

Registro das contrações indiretas - Para evocar as contrações musculares indiretas, a extremidade livre do nervo é aspirada por um eletrodo de platina do tipo "sucção". Um outro eletrodo de platina, mergulhado na solução, serve como eletrodo de referência. Estes eletrodos são conectados a um estimulador elétrico, que por sua vez aplica uma voltagem ao nervo, desencadeando, assim, a transmissão neuromuscular seguida da contração da musculatura. A **figura 4** ilustra o sistema de registro miográfico utilizado para contrações indiretas.

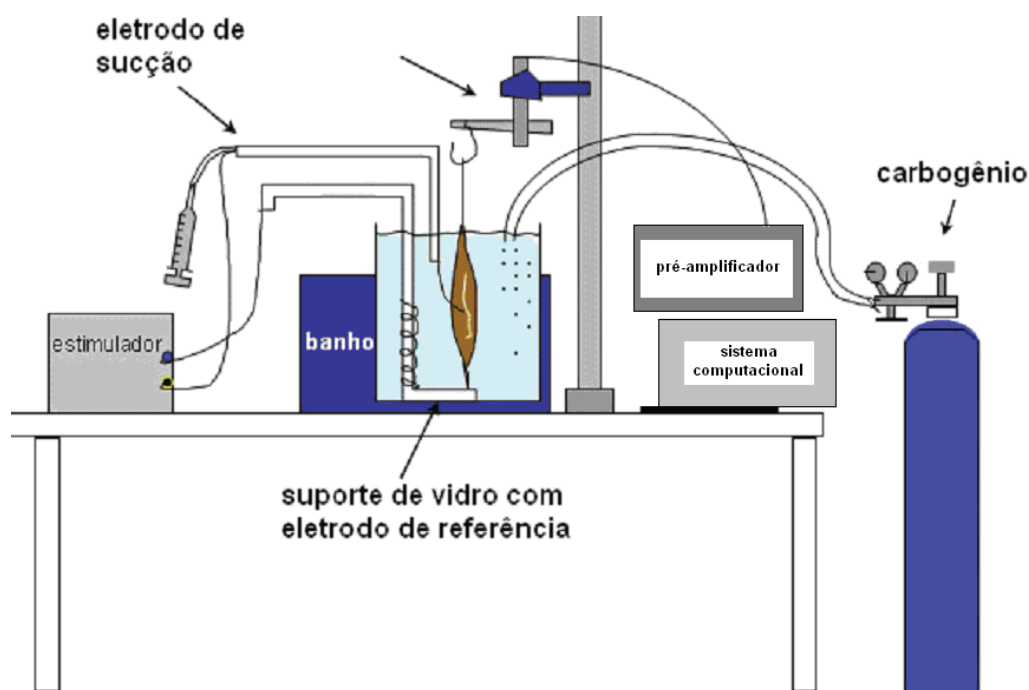


Figura 4: Sistema de registro miográfico para contrações indiretas.

Registro das contrações diretas - Apenas o músculo é preservado durante a dissecação e posicionado entre os pólos de um eletrodo bipolar de platina. O estímulo elétrico é aplicado por meio deste eletrodo bipolar. A voltagem fornecida pelo estimulador elétrico induz uma corrente elétrica no meio e a contração do músculo ocorre devido ao campo elétrico gerado. Para evitar alguma contribuição da contração indireta, é adicionado bloqueador neuromuscular do tipo competitivo à solução nutritiva. A **figura 5** ilustra o sistema de registro miográfico utilizado para contrações diretas.

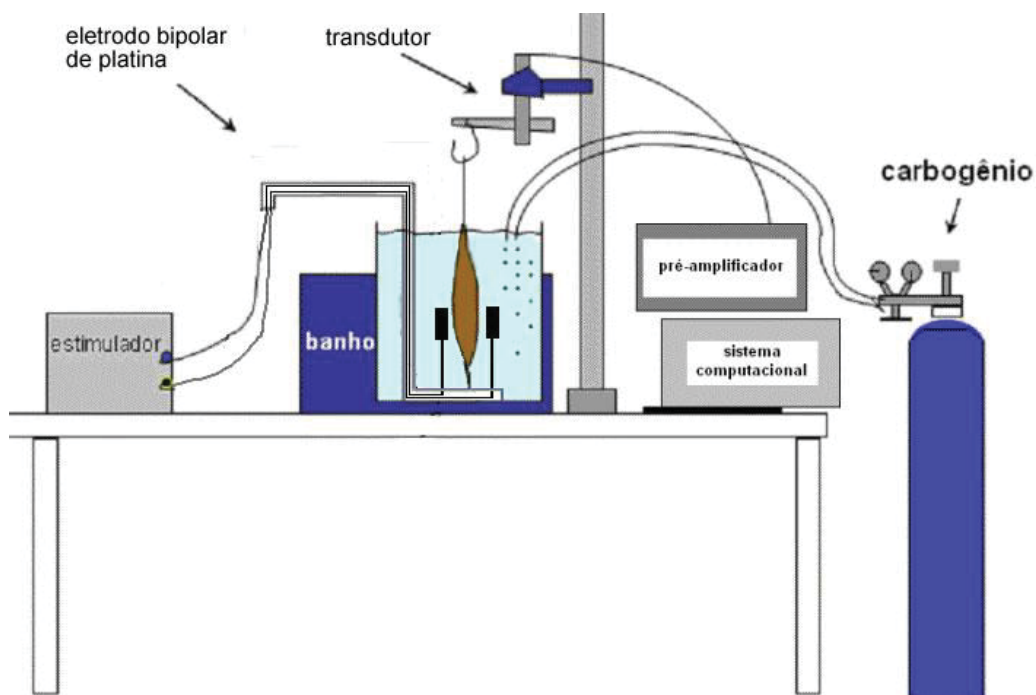


Figura 5: Sistema de registro miográfico para contrações diretas.

Em ambos os tipos de experimentos, isto é indiretos e diretos, a tensão de base das preparações é estabelecida individualmente, de modo a fornecer a tensão máxima, em resposta à aplicação de pulsos elétricos retangulares com intensidade e duração supra-máximas. Os estímulos utilizados para evocar as contrações musculares diretas, no geral, são de maior voltagem e duração do que aqueles utilizados para gerar as contrações indiretas, pois o nervo amplifica o sinal recebido.

As contrações musculares podem ser classificadas em isoladas e tetânicas. As contrações musculares isoladas são geradas por estímulos de baixa frequência aplicados tanto ao nervo motor quanto ao próprio músculo. Neste caso, cada estímulo produz um potencial de ação discreto na membrana da fibra muscular e, conseqüentemente, uma contração distinta. Quando uma série de estímulos de maior frequência é aplicada em um músculo, ou em seu nervo, cada estímulo ainda é capaz de produzir potenciais de ação distintos na membrana muscular, mas as respostas mecânicas, que são mais lentas se fundem e se somam gerando uma contração sustentada denominada contração tetânica.

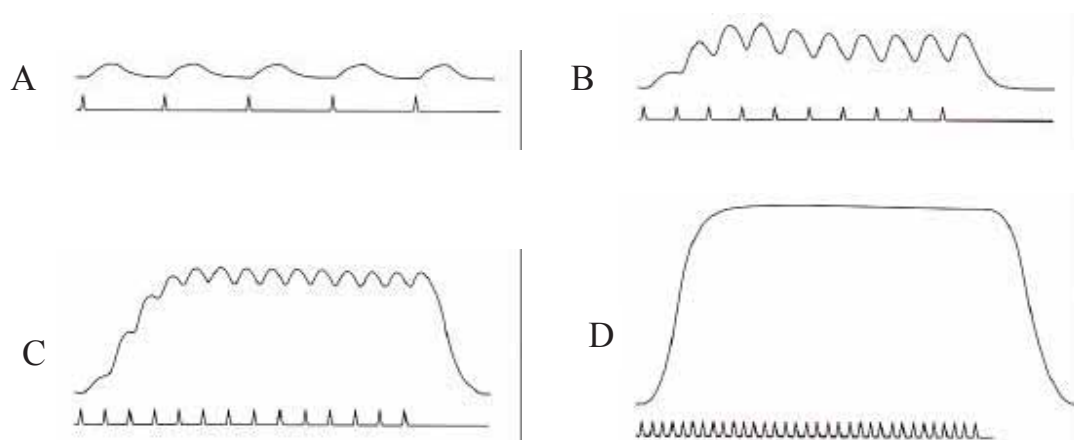


Figura 6: Registro miográfico de contrações musculares em função da frequência de estimulação. A) Contrações musculares isoladas sucessivas. B) Somação temporal de contrações musculares isoladas. C) Contração tetânica incompleta. D) Contração tetânica completa⁽⁵⁾.

2.2 Técnica Eletrofisiológica *in vitro*

As técnicas eletrofisiológicas são aquelas utilizadas para o registro da atividade elétrica das células e dos vários tecidos orgânicos, como por exemplo, o nervoso e o muscular⁽⁶⁾. A medição das diferenças de potenciais elétricos nessas células ou tecidos, porém, enfrenta duas dificuldades: *as correntes elétricas são muito pequenas*, e como são correntes iônicas em meio aquoso e as células, geralmente muito pequenas, *o emprego de eletrodos metálicos é ineficiente*, pois têm elevadíssima *impedância elétrica**, a ponto de não se conseguir “ler” nada. A solução para contornar esses dois obstáculos consiste em utilizar amplificadores de corrente elétrica e microeletrodos de vidro, respectivamente⁽⁷⁾.

***Impedância** é o termo técnico para resistência elétrica no caso de correntes alternadas, isto é, correntes que variam de intensidade e/ou sentido de fluxo de cargas, que é exatamente a realidade quando medimos potenciais em células nervosas. Difere da resistência elétrica convencional porque depende de forma complicada da frequência da corrente e da própria natureza do circuito. No entanto, também obedece à lei de Ohm (V é diretamente proporcional a I , e $V=RI$), caso o condutor seja ôhmico, isto é, quando a resistência à passagem da corrente elétrica não depende da própria corrente. Indica a oposição total que um circuito oferece ao fluxo de corrente alternada, ou qualquer outra corrente variável numa dada frequência⁽⁷⁾.

Os microeletrodos são capilares de vidro que, estirados sob o calor, formam pontas muito finas (0,5 μm ou menos). Estes são preenchidos com uma solução de eletrólitos, no geral KCl (3M) e contém um eletrodo metálico (geralmente de prata e revestido com AgCl) imerso nesta solução. Por intermédio dos microeletrodos pode-se puncionar a membrana celular sem lesá-la grosseiramente e, conectados a aparelhagem adequada, permitem medir com precisão as grandezas elétricas do interior da célula em relação ao exterior, onde posicionamos o chamado eletrodo de referência⁽⁶⁾.

O orifício na ponta do microeletrodo, permite uma certa “continuidade” do meio aquoso intracelular com o do interior do eletrodo, mas não necessariamente favorece que os íons fluam através dele. Esta continuidade favorece uma separação de cargas dentro do microeletrodo no momento em que este entra em contato com o meio eletrolítico que irá medir. Uma vez que geralmente o interior da célula é negativo com relação ao exterior, os íons K^+ dentro do eletrodo, positivos, serão “atraídos” para a ponta do mesmo, e os íons Cl^- , negativos, serão “repelidos” para a outra extremidade, próximo a onde está o fio de prata: este, então, “perceberá” o entorno de cargas negativas (os íons Cl^-) que fazem uma “imitação” precisa do interior negativo da célula. O fio metálico, que é o verdadeiro eletrodo, afinal, faz a medição sem estar efetivamente dentro da célula, situação em que a impedância (resistência) dificultaria um registro adequado⁽⁷⁾.

Para a realização dos registros eletrofisiológicos a preparação neuromuscular é isolada e transferida para uma cuba contendo solução nutriente borbulhada com carbogênio (95% O_2 + 5% CO_2) e mantida à temperatura ambiente. A cuba é constituída de placa de Petri contendo no centro uma lente planoconvexa de acrílico, fixada ao fundo da placa por meio de parafina. A preparação em estudo é estirada

sobre a lente e mantida na posição através de alfinetes que trespassam os tendões, fixando-os à parafina. A cuba contendo a preparação é fixada à platina de uma lupa estereoscópica. Com o uso da transiluminação, pode-se realizar a dissecação fina da preparação para remoção do tecido conectivo. Subsequentemente, a preparação é submetida a registros eletrofisiológicos. Uma representação esquemática da aparelhagem utilizada com esta finalidade aparece na **Figura 7**.

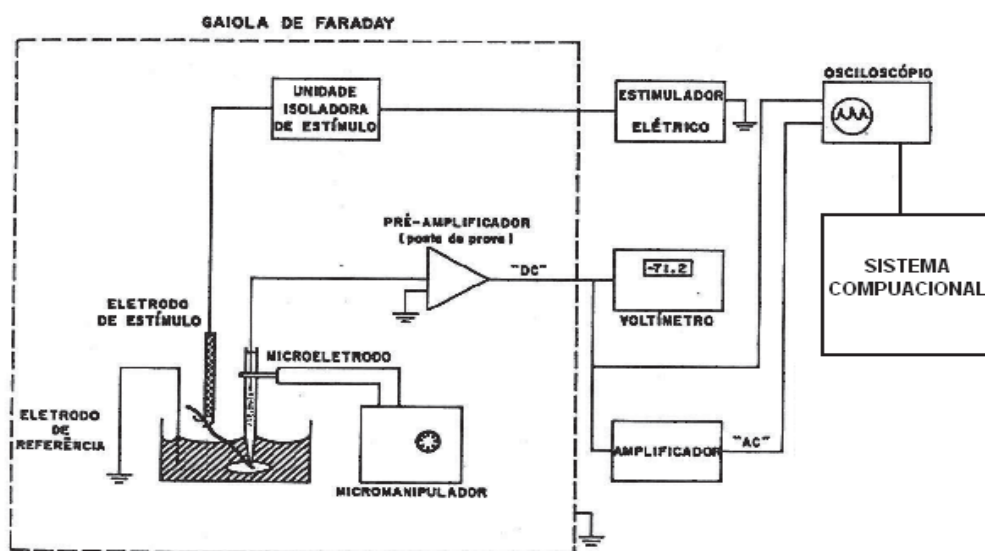


Figura 7: Representação esquemática de uma aparelhagem utilizada em registros eletrofisiológicos.

Para os registros eletrofisiológicos são utilizados microeletrodos de vidro (com as características já descritas), o quais são conectados a um pré-amplificador⁽⁸⁾. O manuseio do microeletrodo é realizado com o auxílio de um micromanipulador e sob observação de lupa estereoscópica. A diferença de potencial através da membrana é medida entre um microeletrodo que permanece inserido intracelularmente e um outro eletrodo extracelular de referência, que deve permanecer mergulhado na solução nutriente que banha a preparação. O eletrodo extracelular também é constituído por um fio de prata previamente recoberto por AgCl. Tal eletrodo deve ficar conectado ao “terra” do pré-amplificador.

Para gerar os potenciais de placa terminal (PsPT), a extremidade livre do nervo motor é colocada em contato com um eletrodo bipolar de platina. O nervo então é estimulado eletricamente com pulsos de intensidade e voltagem supra-máximos.

Os sinais celulares capturados pelo pré-amplificador são registrados simultaneamente em dois diferentes canais de um *osciloscópio**: um de acoplamento resistivo (“DC”), utilizado para registrar o potencial de repouso da membrana; e outro de acoplamento capacitivo (“AC”), utilizado para o registro dos PsPT⁽⁸⁾.

***Osciloscópio** tem a finalidade de produzir num anteparo uma imagem que seja uma representação gráfica de um fenômeno dinâmico, como por exemplo: pulso de tensão, uma tensão que varie de valor com relação ao tempo, a descarga de um capacitor, etc. Os fenômenos que se deseja visualizar na tela podem ter duração que vai de alguns minutos até a alguns milésimos de segundo.

O osciloscópio é composto dos seguintes elementos: fonte de alimentação, tubo de raios catódicos (TRC), base de tempo, amplificador horizontal, amplificador vertical. A parte principal de um osciloscópio é o TRC. Este tubo necessita, entretanto, usar uma série de circuitos auxiliares capazes de controlar o feixe desde sua geração até o ponto de sua incidência sobre a tela. O TRC é um bulbo de vidro dentro do qual existe vácuo relativo, onde foram dispostos: um canhão eletrônico, quatro placas defletoras, uma camada de material fosforescente e um ânodo coletor. A função do canhão eletrônico é emitir um feixe estreito de elétrons, com uma certa velocidade, em direção à tela. A parte frontal do TRC é revestida internamente por uma camada de material fosforescente que, ao ser atingida pelo feixe de elétrons, emite luz naquele ponto. A intensidade desta luz é proporcional à intensidade do feixe de elétrons. Normalmente o feixe emitido pelo canhão atinge a tela no centro, mas é possível fazermos o feixe incidir em outro ponto da tela. Esta é a função das placas defletoras: desviar a trajetória do feixe. Dependendo das tensões aplicadas nas placas defletoras verticais e horizontais podemos deslocar o ponto luminoso para qualquer posição na tela. Depois que os elétrons colidem com a camada fosforescente, eles são atraídos e coletados pelo ânodo coletor, já que este é polarizado positivamente em relação ao cátodo.

Na maioria dos casos o osciloscópio é utilizado para a análise de uma forma de onda, ou seja, a variação de uma tensão em função do tempo. Para que isto aconteça é necessário que o ponto luminoso se desloque na tela com uma velocidade constante no sentido horizontal que é o eixo do tempo. Como os sinais que se deseja medir, nem sempre tem uma amplitude adequada para as placas defletoras, há necessidade de amplificadores: horizontal e vertical, e também um atenuador para adequar o sinal ao amplificador⁽⁹⁾.

Para o registro dos PsPT, a placa motora deve ser localizada, por tentativa e erro, impalando-se o microeletrodo na fibra muscular esquelética ao redor da terminação nervosa. Considera-se que o microeletrodo está corretamente posicionado

na placa motora quando se registra PsPT com tempo de crescimento de 1 milisegundo e com a maior amplitude observada naquela região⁽⁸⁾.

É importante ressaltar que a maior parte do sistema de registro eletrosiológico é mantida no interior de uma *Gaiola de Faraday**, com o objetivo de reduzir a interferência elétrica do ambiente (ruído de fundo) e permitir um registro acurado dos sinais bioelétricos.

***Gaiola de Faraday** é uma blindagem elétrica, ou seja uma superfície que envolve uma dada região do espaço e que pode, em certas situações, impedir a entrada de perturbações produzidas por campos elétricos e/ou eletromagnéticos externos.

3. Projeto de Iniciação Científica

Paralelamente ao aprendizado das técnicas, foi desenvolvido um projeto de iniciação científica que descreve ação do extrato etanólico da planta *Tabernaemontana catharinensis* (Tc) sobre o bloqueio neuromuscular induzido por toxinas ofídicas na preparação do nervo frênico e músculo diafragma isolado de camundongos.

3.1 Introdução

No Brasil, o número de acidentes ofídicos vem aumentando ano a ano com registro de 28.597 casos em 2005, e letalidade em torno de 0,4%⁽¹⁰⁾. Destacam-se as serpentes do gênero *Bothrops*, que representam 85% das notificações⁽¹¹⁾.

Os venenos ofídicos são misturas complexas constituídas principalmente por proteínas, 70 a 90% do peso seco do veneno, em sua maioria toxinas ou enzimas com atividade tóxica. A fração não-protéica é representada por carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas e componentes inorgânicos⁽¹²⁾. Grande parte da toxicidade desses venenos é determinada pela ação de proteínas multifuncionais denominadas toxinas fosfolipases A₂ (PLA₂s). Estas podem ser divididas em dois grupos principais: as PLA₂s Asp49 que apresentam um resíduo de ácido aspártico na posição 49 e elevada atividade catalítica; e as PLA₂s Lys49 que apresentam substituição do resíduo de ácido aspártico na posição 49 pela lisina e são enzimaticamente inativas^(13, 14).

A brotostoxina-I (BthTX-I), principal miotoxina isolada do veneno da *Bothrops jararacussu*⁽¹⁵⁾, é uma PLA₂ Lys49 homóloga, enzimaticamente inativa. Esta toxina induz intensa mionecrose, caracterizada por lesões musculares e por aumento da liberação de creatina quinase (CK). Embora a BthTX-I não apresente efeitos neurotóxicos característicos *in vivo*, promove despolarização das fibras musculares, inibição do potencial de ação e paralisia das contrações musculares, evocadas direta ou indiretamente, em preparações neuromusculares *in vitro*^(16, 17, 18, 19). O mecanismo da ação bloqueadora neuromuscular da BthTX-I, bem como a sua relação com a atividade miotóxica são pouco conhecidos.

O tratamento mais eficaz para os acidentes ofídicos é a soroterapia passiva. No entanto, esta é limitada pelo alto custo, por efeitos adversos, pela dificuldade do acesso a soroterapia por algumas comunidades, e pela constatação de que os efeitos locais de alguns tipos de envenenamento não são totalmente neutralizado pelo anti-veneno⁽²⁰⁾. Assim, a busca por métodos alternativos ou complementares à soroterapia é fundamental.

Extratos vegetais apresentam uma grande diversidade de compostos químicos com várias atividades farmacológicas de interesse médico-científico. Um grande número de extratos vegetais já foi testado e mostraram atividade anti-ofídica^(21, 22, 23, 18).

A *Tc*, popularmente conhecida como “leiteiro de vaca”, é uma espécie arbórea que ocorre na Argentina, Paraguai, Bolívia e sudeste do Brasil. VERONESE et al demonstraram que o extrato aquoso desta planta reduz a atividade miotóxica da BthTX-I isolada do veneno da *Bothrops jararacussu*⁽²⁴⁾. No entanto, não há registro de estudos que avaliem o efeito do extrato etanólico de *Tc* sobre a atividade neuromuscular da BthTX-I.

3.2 Objetivos

Caracterizar a interação do extrato etanólico de *Tc* com a BthTX-I, através de abordagem miográfica *in vitro*, no sentido de avaliar a potencialidade antiofídica desta planta, bem como, de contribuir para um melhor conhecimento do mecanismo de ação da BthTX-I na junção neuromuscular.

3.3 Material e Métodos

Na realização dos experimentos, foram utilizados camundongos Swiss (20-25g), machos, adultos, fornecidos pelo Biotério Central da Unesp, campus de Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12/12 h).

Os animais foram agrupados da seguinte forma: Grupo Controle (**C**); Grupo *Tabernaemontana catharinensis* (**Tc**), Grupo toxina PLA₂ Lys49 (**BthTX-I**); Grupo toxina PLA₂ Lys49 + Tc (**BthTX-I -Tc**). A pré-incubação da BthTX-I com o extrato etanólico de Tc, em solução salina, foi realizada à 30°C , por 30 minutos.

O extrato etanólico de Tc foi fornecido pelo Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira da Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

Para a realização dos experimentos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. As preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos foram removidas e montadas verticalmente em cuba para órgão isolado contendo 15 ml de solução nutriente (composição mM/l, em água destilada: NaCl - 135; KCl - 5; MgCl₂ - 2; NaHCO₃ - 15; Na₂HPO₄ - 1; CaCl₂ - 2; glicose - 11), constantemente borbulhada com carbogênio. As preparações foram mantidas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. A região costal do músculo diafragma foi conectada a um suporte de vidro em forma de “L” e o tendão foi conectado a um transdutor de tensão isométrica.

A preparação foi submetida a um período de estabilização de 45 minutos, durante o qual foi estimulada na frequência de 0.2 Hz e o líquido nutriente presente na cuba foi trocado a cada 15 minutos. Após a estabilização, foram realizados 15 minutos de registro de contrações controle (ausência das toxinas). A seguir, a BthTX-I ou o produto de pré-incubação desta toxina com extrato etanólico de Tc foi adicionado ao banho. Também foram realizados experimentos controles para avaliar o desgaste natural da preparação. Foi avaliado o decréscimo percentual da amplitude das contrações musculares indiretas em 90 minutos.

Os resultados foram agrupados em média e erro padrão da média. As diferenças entre os valores médios foram testadas através da análise estatística utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA, para a comparação de mais de duas amostras), complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

3.4 Resultados Preliminares e Discussão

Como ilustrado na **Figura 8 (A e B)**, a BthTX-I (1 μ M) promoveu decréscimo tempo-dependente da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente. Este efeito se estabeleceu de forma significativa a partir de 15 minutos do contato da toxina com a preparação. O tempo para a redução de 50% da amplitude das contrações indiretas foi de $41,16 \pm 9,32$ (n=6). Após 90 minutos de contato com a BthTX-I, a amplitude das contrações indiretas correspondeu a 17,39% do valor do controle.

O extrato etanólico de Tc (1:10, peso/peso) neutralizou parcialmente o bloqueio neuromuscular induzido pela BthTX-I. Este efeito foi significativo a partir de 15 minutos de contato do produto de pré-incubação com a preparação. Após 90 minutos de contato, o extrato de Tc neutralizou em 35,13% o efeito da BthTX-I. No entanto, isoladamente, o extrato de Tc promoveu bloqueio significativo das contrações indiretas a partir de 15 minutos (**Figura 8B**). Na relação de 1:5 o extrato vegetal não neutralizou significativamente o efeito da toxina (**Figura 8A**).

Os resultados parciais do presente estudo indicam que a BthTX-I induz efeito bloqueador neuromuscular na preparação frênico-diafragma de camundongos, caracterizado pelo decréscimo das contrações musculares indiretas. Tais achados são semelhantes aos previamente descritos para a BthTX-I^(16, 19).

A literatura apresenta evidências de que o extrato de Tc reduz a atividade miotóxica do veneno bruto da *Bothrops jararacussu* e de sua miotoxina isolada, BthTX-I, tanto *in vivo* quanto *in vitro*⁽²⁴⁾. No presente estudo, demonstrou-se que o extrato etanólico desta planta neutraliza parcialmente o bloqueio neuromuscular *in vitro* induzido pela BthTX-I. Todavia, na concentração em que promove tal efeito, o extrato vegetal, isoladamente,

manifestou toxicidade sobre o processo de transmissão neuromuscular, que foi caracterizado pelo bloqueio parcial das contrações indiretas.

Em vista do exposto, os resultados obtidos até o momento indicam que a toxicidade da Tc limita seu uso como agente terapêutico, porém esta pode ser um importante instrumento de estudo do mecanismo de ação de PLA₂s ofídicas. Sendo assim, as informações obtidas nesta investigação foram utilizadas como ponto de partida para a pesquisa de substâncias isoladas da Tc que apresentem potencial atividade antiofídica e baixa toxicidade. Com este objetivo, encontra-se em andamento no laboratório o estudo da interação da BthTX-I com o alcalóide 12-metoxi-4-metilvoachalotina (MMV), isolado da Tc.

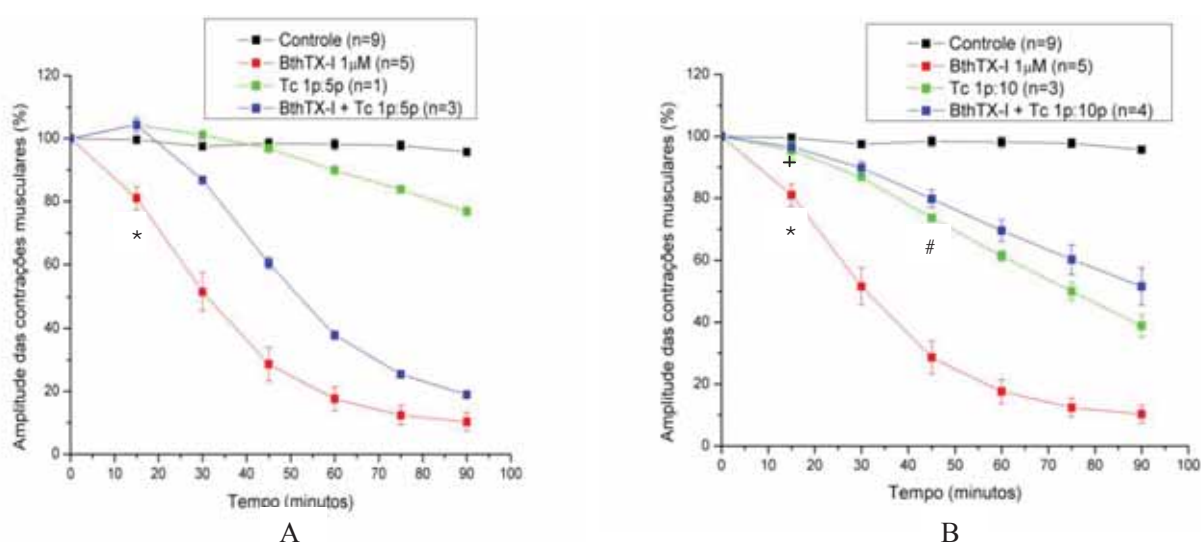


Figura 8 (A e B): Influência da Tc sobre a atividade da BthTX-I nas contrações musculares evocadas indiretamente em preparações frênico-diafragma de camundongos. A ordenada representa a % da amplitude das contrações musculares em relação à amplitude inicial. A abscissa indica o tempo (min) após a adição da toxina ou da mistura da toxina mais extrato de Tc pré-incubadas. Os pontos são a média \pm S.E.M. de 1-9 experimentos. * e # indica, respectivamente, o ponto em que a diferença da BthTX-I e Tc em relação ao controle se tornam significativos. + indica o ponto em que diferenças entre a BthTX-I + Tc em relação a BthTX-I se tornam significantes. (P <0,05).

4. Bibliografia

- 1- COSTANZO, L.S. Fisiologia celular. In: **Fisiologia**. 3.ed. São Paulo: Elsevier, 2007. cap. 1, p.1-44.
- 2 - KUTCHAI, H.C. Transmissão sináptica. In: BERNE, R.M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. (Eds). **Fundamentos de Fisiologia**. 4. ed. São Paulo: Elsevier, 2006. p.42-57.
- 3 - GALACCI, M.; OLIVEIRA, A.C. Farmacologia da Junção Neuromuscular. In:**Farmacologia Integrada**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. p. 175-183.
- 4 - SOARES, S.A.; NOLL, V. **Transdutores de movimento, velocidade e força**. Disponível em: <<http://florianopolis.ifsc.edu.br/vnoll/transdutores2.pdf>> Acesso em 27 out. 2010.
- 5 - BALDO, M.V.C. **Fisiologia do Movimento Humano**. Disponível em:<<http://www.fisio.icb.usp.br/aulasfisio/cursos/mdidatico/movimento.pdf>>. Acesso em 21 set. 2010.
- 6 - OLIVEIRA, A.C.; GALLACCI, M. Transmissão neuromuscular esquelética. Aspectos morfológicos, fisiológicos e farmacológicos. In: **Miastenia Grave**. São Paulo: J.L. Assis, 1990. p.121-159.
- 7 - QUILLFELDT, J.A. **Origem dos Potenciais Elétricos das Células Nervosas**. v.3, p.1-35, 2005. Disponível em:<<http://www.ufrgs.br/biofis/bio10004/potenciais2005.pdf>>. Acesso em 26 jun. 2010.
- 8 - GALLACCI, M. **Mecanismos de Inibição de Wedensky induzida pelo pancurônio na musculatura esquelética do rato “in vitro”**. 1990. Dissertação (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 9 - BARTNIG, R.W.; PURIM, C.A. **Osciloscópio**. Disponível em: <<http://www.radiopoint.com.br/eletronica/datasheets/osciloscopio.pdf>> Acesso em 22 set. 2010.
- 10 - BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Situação atual do ofidismo**. Brasília 2005.

- 11 - BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, v.19, p.7-16, 2003.
- 12 - DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In: Bucherl W, Buckley E, Deulofen V, editors. *Venomous animals and their venoms*. New York: **Academic Press**, 1971.
- 13 - OWNBY, C.L.; SELISTRE DE ARAUJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v.37, p.441-5, 1999.
- 14 - LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon** v.42, p.885-901, 2003.
- 15 - HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon** v.26, p.615-627, 1988.
- 16 - OLIVEIRA, M.; CAVALCANTE, W.L.G.; ARRUDA, E.Z.; MELO, P.A.; DAL PAI-SILVA, M.; GALLACCI, M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. **Toxicon**, v.42, p.373-379, 2003.
- 17 - CAVALCANTE, W.L.G.; DAL PAI-SILVA, M.; GALLACCI, M. Influence of temperature upon paralyzing and myotoxic effects of bothropstoxin-I on mouse neuromuscular preparations. **Chem Biological Interac**, v.151, p.95-100, 2005.
- 18 - CAVALCANTE, W.L.G.; CAMPOS, T.O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake Venom phospholipase toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J Ethnopharmacol**, v.112, p.490-7, 2007.
- 19 - GALLACCI, M.; OLIVEIRA, M.; DAL PAI-SILVA, M.; CAVALCANTE, W.L.G.; SPENCER, P.J. Paralyzing and myotoxic effect of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on

mouse neuromuscular preparations. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.57, p.39-45, 2006.

20 - GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** v.33, p.1405-1424, 1995.

21 - MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v.30, p.1131-1142, 1992.

22 - MORS, W.B.; NASCIMENTO, M.C.; PEREIRA, B.M.; PEREIRA, N.A. Plant natural products active against snake bite the molecular approach. **Phytochemistry**, v.55, p.627-42, 2000.

23 - SOARES, A.M.; JANUÁRIO, M.V.; PREIRA, A.M.S.; PEREIRA, P.S. Neutralizing effects of Brazilian plants aginstsnaka venoms. **Drugs of the future**, v.29, p.1105-1117, 2004.

24 - VERONESE, E.L. et al. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine**, v.12, p.123-30, 2005.