

DIMAS DOS SANTOS ROCHA JUNIOR

**EFEITOS DO DIMETILAMINOETANOL (DMAE)
EM PREPARAÇÃO NEUROMUSCULAR**

CAMPINAS

Unicamp

2008

DIMAS DOS SANTOS ROCHA JUNIOR

**EFEITOS DO DIMETILAMINOETANOL (DMAE)
EM PREPARAÇÃO NEUROMUSCULAR**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Co-Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R582e Rocha Júnior, Dimas dos Santos
 Efeitos do Dimetilaminoetanol (DMAE) em preparação
 neuromuscular / Dimas dos Santos Rocha Júnior. Campinas, SP :
 [s.n.], 2008.

Orientadores : Léa Rodrigues Simioni, Yoko Oshima Franco
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cosméticos. 2. Deanol®. 3. Junção neuromuscular. I.
Simioni, Lea Rodrigues. II. Franco, Yoko Oshima. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

**Título em inglês : Effects of dimethylaminoethanol (DMAE) in
neuromuscular preparation**

Keywords: • Cosmetic
 • Deanol
 • Neuromuscular Junction

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

**Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni
Prof. Dr. Marcos Moisés Gonçalves
Profa. Dra. Carolina Ribeiro de Borja Oliveira**

Data da defesa: 20 - 08 - 2008



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Léa Simioni", is written over the name.

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

A large, stylized handwritten signature in black ink, appearing to read "Yoko Oshima Franco", is written over the name.

Membros:

Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

A large, stylized handwritten signature in black ink, appearing to read "Yoko Oshima Franco", is written over the name.

Profa. Dra. Caroline Ribeiro de Borja Oliveira

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Caroline", is written over the name.

Prof. Dr. Marcos Moises Gonçalves

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcos Moises Gonçalves", is written over the name.

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/08/2008

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que são exemplos de humildade, honestidade e coragem e que me criaram a luz da fé cristã. A minha namorada que nos momentos difíceis apoiou a mim e a minha família. Aos meus avós que contribuíram para minha educação, a Prof^a. Yoko Oshima Franco pela oportunidade e aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois me permitiu vencer minhas dificuldades visuais surgidas durante o curso, devolvendo-me saúde e conforto.

Aos meus pais, Dimas dos Santos Rocha e Maria do Carmo de Moraes Rocha que me encorajaram, deram exemplo, suporte físico, financeiro e emocional para dar continuidade aos estudos. Obrigado por TUDO.

Agradeço minha namorada Renata Fogaça, que sempre esteve e sempre estará ao meu lado, superando as dificuldades e presenciando vitórias.

À Prof.^a Yoko Oshima Franco que me resgatou e ajudou-me a retomar os estudos após meu restabelecimento visual. Obrigado pela paciência e por acreditar em meu potencial

À Prof.^a. Léa Rodrigues Simioni que me abriu portas para o início de minha vida acadêmica. Obrigado pelo conhecimento herdado.

Ao técnico de Laboratório Gildo Bermado Leite que com sua paciência e eterna boa vontade, ensinou o funcionamento de equipamentos e técnicas do laboratório.

Agradeço a meus amigos: Sandro, Thiago e Mariana pela amizade sincera e ajuda nos momentos mais difíceis.

À minha avó Florypes, minha querida avó materna e aos meus avôs paternos Maria José e Francisco Rocha.

Aos meus Primos: Cíntia, Maurício, Ana Paula, Mariana, Ana Letícia e Felipe.

Aos meus tios: Mário, Ana Elisa, José Francisco e Maurício.

Aos meus cunhados e também irmãos: Marcelo, José Luis, Fernando, Ari, Simara, Neuci e Lia.

À minha cunhada Teresa, que se foi precocemente, porém, deixando muita luz para todos.

Aos meus sogros Maria e Luis Fogaça que me apoiaram e rezaram pelo meu restabelecimento

Aos meus divertidos concunhados Altair, Amauri e Jorge. Um abraço!

Ao Dr. Cláudio Muranaka que iluminado por Deus, realizou meu transplante de córnea com sucesso.

Ao Dr. Edson Antunes pelo excelente trabalho desempenhado como coordenador do curso de Farmacologia da Universidade de Campinas.

Agradeço a TODOS que rezaram e rezam por mim. Graças aos seus incessantes pedidos tive uma ótima recuperação.

Santa Luzia, que me intercedeu junto a Deus e atendeu meus pedidos.

Muito obrigado e que Deus ilumine vossos caminhos!

Origem Impenetrável da Sabedoria

“Toda sabedoria vem do Senhor Deus,

Ela sempre esteve com ele.

Ela existe antes de todos os séculos.

*Quem pode contar os grãos da areia do mar,
as gotas de chuva, os dias do tempo?*

*Quem pode medir a altura do céu, a extensão da
terra, a profundidade do abismo?*

*Quem pode penetrar a sabedoria divina, anterior
a tudo?*

A sabedoria foi criada antes de todas as coisas,

A inteligência prudente existe todos os séculos!

*O verbo de Deus nos céus é fonte de sabedoria,
seus caminhos são os mandamentos eternos”.*

Eclo 1, 1-6.

	PÁG.
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1- INTRODUÇÃO.....	14
2- OBJETIVOS.....	17
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1- Animais.....	20
3.2- Material.....	20
3.3- Solução Nutritiva.....	20
3.4- Técnica Miográfica: Preparação nervo frênico – diafragma (NFD) de camundongo.....	20
3.5- Técnica Eletrofisiológica.....	21
3.6- Análise estatística.....	22
4- RESULTADOS.....	23
4.1- Estudo miográfico.....	24
4.2- Estudo eletrofisiológico.....	27
5- DISCUSSÃO.....	29
6- CONCLUSÃO.....	33
7- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Semelhança entre as estruturas químicas: dimetilaminoetanol, colina e acetilcolina.....	15
Figura 2- Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos.....	25
Figura 3- Curva dose-resposta de dimetilaminoetanol.....	26
Figura 4- Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo direto e indireto.....	27
Figura 5- Determinação do conteúdo quântico em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos (técnica eletrofisiológica)....	28

RESUMO

O dimetilaminoetanol (DMAE) é comercializado em vários países como suplemento da dieta, amplificador da cognição e também como matéria-prima de produtos cosméticos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprovou o uso cosmético em 2002, visando a uma ação antienvelhecimento, após a observação do efeito colateral decorrente da administração oral do medicamento Deanol-®: contração involuntária da musculatura do rosto e do pescoço. Pesquisou-se, neste trabalho, a ação do DMAE em preparação isolada do nervo frênico-diafragma de camundongos, utilizando-se técnicas miográfica e eletrofisiológica. DMAE, sob o parâmetro miográfico, mostrou dois efeitos neuromusculares principais, dependentes da concentração: o facilitador da neurotransmissão (1 mg/mL, n = 6 e 4 mg/mL, n = 11) e o bloqueador neuromuscular completo aos 40 minutos (20 mg/mL, n = 4). Em preparações previamente curarizadas (d-Tubocurarina, 10 µg/mL) e sob estímulo direto, o DMAE (8 mg/mL, n = 3) aumentou a amplitude da contração muscular (30%), mostrando uma ação direta sobre a fibra muscular; enquanto sob estímulo indireto, demonstrou não possuir ação anticolinesterásica. O DMAE, sob o parâmetro eletrofisiológico, agiu pré-sinápticamente sobre a terminação nervosa, constatado pelo aumento gradativo dos valores de conteúdo quântico (1 mg/mL, n = 4). As implicações desses resultados são discutidas neste trabalho.

Palavras chave: Técnicas cosméticas, Deanol® e Junção Neuromuscular.

ABSTRACT

The dimethylaminoethanol (DMAE) is commercialized in several countries as diet supplement, amplifier of the cognition and also as substance in the constitution of cosmetic products. In Brazil, the cosmetic use was approved by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária, in 2002, aiming at an antiaging action, after the collateral effect from oral Deanol® administration: the involuntary contraction of the face and the neck muscles. The objective of this work was to study the DMAE action in isolated mouse phrenic nerve-diaphragm preparation, using myographical and electrophysiological techniques. DMAE, under myographical parameter, showed two main neuromuscular and concentration-dependents effects: the facilitatory (1 mg/mL, n = 6 and 4 mg/mL, n = 11) and the neuromuscular blocker at 40 min (20 mg/mL, n = 4). In pre-curarized preparations (d-Tubocurarine, 10 µg/mL) and under direct stimuli, DMAE (8 mg/mL, n = 3) increased the amplitude of muscular contraction (30%), showing a direct action on the muscular fiber; whereas under indirect stimuli, showed to have no anticholinesterasic action. DMAE, under electrophysiological parameter did act presynaptically on the nervous terminal by a gradual increase of quantum content values (1 mg/mL, n = 4). The implications of these results are argued in this work.

Keywords: Cosmetic Techniques, Deanol® and Neuromuscular Junction.

1- INTRODUÇÃO

O Food and Drug Administration (FDA) autorizou a comercialização do DMAE, enfocando sua efetiva ação na síndrome da fadiga crônica, depressão leve, distúrbio de comportamento associado à hiperatividade e problemas de aprendizado, com diminuição da compreensão e/ou da concentração (Martindale et al., 1993; Shubert e Ceder, 1977; Lewis et al, 1975; Rotta e Guardioli, 1996.). O DMAE também tem sido usado para aliviar sintomas motores em pacientes com discinesia (Jameson et al., 1977) e discinesia tardia induzida por neurolépticos, com bons resultados segundo alguns autores (Simpson et al., 1977) ou não, segundo outros (Tammenmaa et al., 2002), além de uso em distúrbios motores associados com hipofunção colinérgica.

De forma contrária, Haug e Holzgraefe (1991) verificaram que adultos tratados com DMAE por 10 anos consecutivos desenvolveram uma marcante síndrome de discinesia que afeta predominantemente a musculatura orofacial e respiratória. Estudos *in vitro* demonstraram que o DMAE produz malformações no tubo neural de embriões de camundongos (Fisher et al., 2001), corroborando prévios estudos desses pesquisadores (Fisher et al., 2002) com conseqüências não conhecidas sobre conceitos humanos.

Como se percebe, muitos esforços têm sido envidados para o entendimento do modo de ação deste agente quando usado por via oral, principalmente decorrente do seu uso crônico, como acima abordado. Entretanto, uma nova forma de uso introduzida entre os anos de 1999 e 2002, o tópico, visando a um efeito tensor com ação antienvelhecimento — ainda carente de estudos que comprovem a eficácia — teve aprovação do FDA (Perricone, 2001; Uhoda et al 2002) e posteriormente, também no Brasil, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), conforme a Resolução – RDC 178, publicada no Diário Oficial de 18 de junho de 2002.

2- OBJETIVOS

Uma vez que estudos do uso tópico do DMAE ainda são raros, neste trabalho pesquisaram-se os efeitos do DMAE em preparações neuromusculares isoladas (simulando o uso tópico deste agente em formulações cosméticas), para verificar o seu espectro de ação farmacológico na fibra muscular esquelética.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Utilizaram-se camundongos Swiss fornecidos pela Central de bioterismo (UNICAMP), mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia (FCM-UNICAMP), com peso entre 25g e 30 g, e recebendo ração e água *ad libitum*. A pesquisa teve aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA-IB - UNICAMP), sob protocolo 630-3.

3.2- Material

Adquiriu-se o bitartarato de dimetilaminoetanol, doravante referido apenas como DMAE, do laboratório Galena, São José do Rio Preto, SP.

3.3- Solução Nutritiva

Solução de Tyrode (mM): NaCl 137;KCL 2,7;CaCl₂ 1,8;MgCl₂ 0,49; NaHCO₃ 11,9 e glicose 11,1.

3.4- Técnica Miográfica: Preparação nervo frênico – diafragma (NFD) de camundongo

Camundongos foram sacrificados pela secção e sangria dos vasos cervicais, após anestesia com hidrato de cloral 10% (300 mg/kg, i.p.). A preparação — retirada segundo técnica para rato descrita por Bülbbring (1946) — colocada em cuba contendo 5 mL de solução de Tyrode, presa nos músculos da costela por ganchos existentes na base da cuba, mantida à temperatura de 37°C e aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂), recebeu vários tratamentos, conforme descritos abaixo. O acoplamento entre o transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM (Kulite Semiconductor Products, Inc, Leonia, New

Jersey, USA) e o fisiógrafo Gould Universal Amplifier Model RS 3400 (Cleveland, USA) permitiu o registro da força de contração muscular, de preparações submetidas à tensão constante de 5 g/cm e à estimulação indireta (nervo frênico) gerada por estimulador S48F (Grass Instruments, Quincy, Massachusetts, USA), de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência. Após a estabilização da preparação, adicionaram-se ao banho: 1,25; 5; 20; 40; 60 e 100 mg de DMAE solubilizados em solução nutritiva de Tyrode, perfazendo as concentrações finais de 0,25; 1; 4; 8; 12 e 20 mg/mL, respectivamente. Todo protocolo experimental teve duração de 120 min. Obteve-se a curva concentração-resposta e comparou-se com a condição controle (solução de Tyrode apenas). Algumas preparações curarizadas com d-Tubocurarina (d-Tc, 10 µg/mL, Abbot laboratórios) receberam simultaneamente estímulos direto (2 ms, 80 V) e indireto e foram, então, tratadas com DMAE 8 mg/mL.

3.5- Técnica Eletrofisiológica

Retirou-se o músculo diafragma cortado ou *cut muscle* com nervo frênico (preparação NFD camundongo descrita no item 3.4.), segundo a técnica de Barstad e Lilleheil (1968) adaptada para camundongos (Banker et al. 1983). Essa preparação é usada para impedir a propagação do potencial de ação muscular, evitar o processo contrátil e permitir a captação do potencial da placa terminal.

Fixou-se o conjunto (músculo cortado e nervo) horizontalmente por meio de alfinetes, em cuba revestida com resina e silicone (*Dow corning Sylgard*) preenchido com solução nutritiva tyrode. Manteve-se a temperatura em torno de 28° C com o auxílio de uma lâmpada de raios infravermelhos, e aerou-se a preparação com carbogênio. Observaram-se as preparações (antes e depois da adição de DMAE 1mg/mL, concentração eleita após ensaios pilotos com concentrações menores, que não alteraram a resposta basal), por 60 minutos (tempo ideal na técnica de eletrofisiologia para a medida de biopotenciais, cuja captação é muito delicada e trabalhosa, diferente da técnica miográfica que é mais

resistente e permite ensaios de longa duração), com lupa (Wild m7 S - Switzerland) de capacidade para aumentos até 40 vezes. Utilizou-se a técnica de Fatt e Katz (1951) com introdução intracelularmente de microeletrodos de vidro sobre as fibras musculares, com o auxílio de um micromanipulador Leitz, para a obtenção do potencial da placa terminal (PPT), usando software Aqdados 4 (Lynx) e armazenado em computador para posterior análise.

3.6- Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão e a significância das diferenças observadas, determinadas pelo teste *t-Student*. Considerou-se significativo o valor obtido como $p > 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Estudo miográfico

Os efeitos farmacológicos mais expressivos do DMAE são mostrados na figura 2. Na concentração de 0,25 mg/mL ($n = 6$) não houve alteração significativa da resposta basal, quando comparada à condição controle de Tyrode ($n = 10$). As concentrações de 1 mg/mL ($n = 6$) e 4 mg/mL ($n = 11$) causaram facilitação (com aumentos de $14 \pm 5,0$ e $51 \pm 9,0\%$, respectivamente), declinando ligeiramente para $5 \pm 4,0$ e $23 \pm 8,0\%$, respectivamente, e mantidos até os 120 min de observação. Na concentração de 12 mg/mL observou-se facilitação (aumento da amplitude da resposta contrátil de $43 \pm 4,5\%$, $n = 14$), que aumentou progressivamente até $71 \pm 8,0\%$ aos 120min, em relação ao controle. A concentração de 20 mg/mL causou 50% de paralisia em um tempo de $T_{50} = 18 \pm 2,5$ min ($n = 4$). Os registros miográficos comprovando os eventos farmacológicos — facilitação da neurotransmissão e bloqueio da resposta contrátil ou ausência de efeito — são mostrados na figura 2 (A, controle Tyrode; B, DMAE 0,25 mg/mL; C, DMAE 8 mg/mL; D, DMAE 12 mg/mL e E, DMAE 20 mg/mL). Nota-se que, após a lavagem da preparação e suposta retirada da substância, a resposta contrátil é mantida (fig. 2 B, C e D) ou restabelecida, mesmo tendo ocorrido total bloqueio neuromuscular durante a vigência do experimento (fig. 2E).

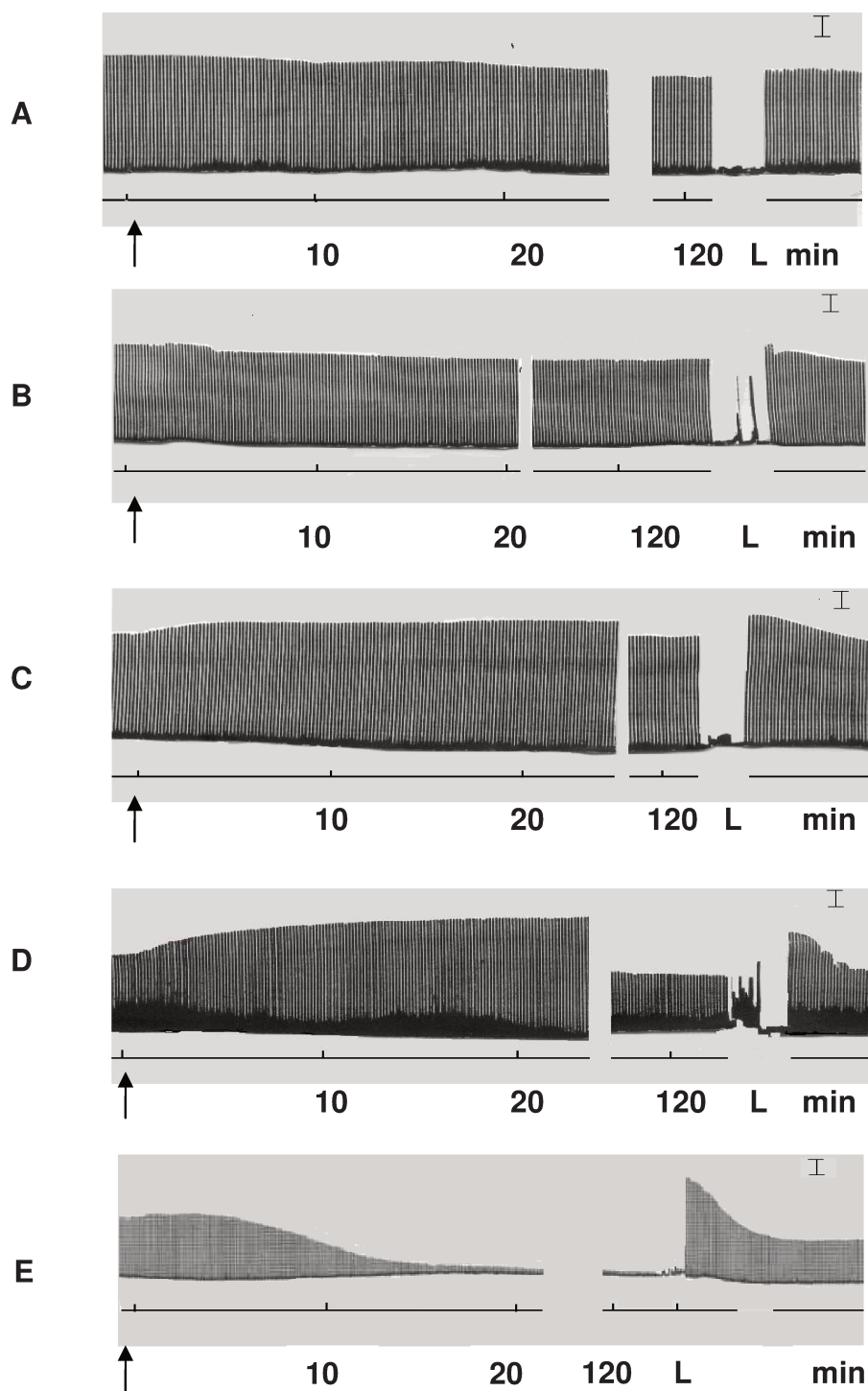


Figura 2- Registros miográficos representativos do efeito farmacológico do DMAE em preparações nervo frênico - diafragma de camundongos (técnica miográfica), sob estímulo indireto, nas concentrações de (mg/mL) B, 0,25; C, 8; D, 12; E, 20; comparados ao controle A (solução Tyrode). L, lavagem. Barra de calibração: 5g/cm.

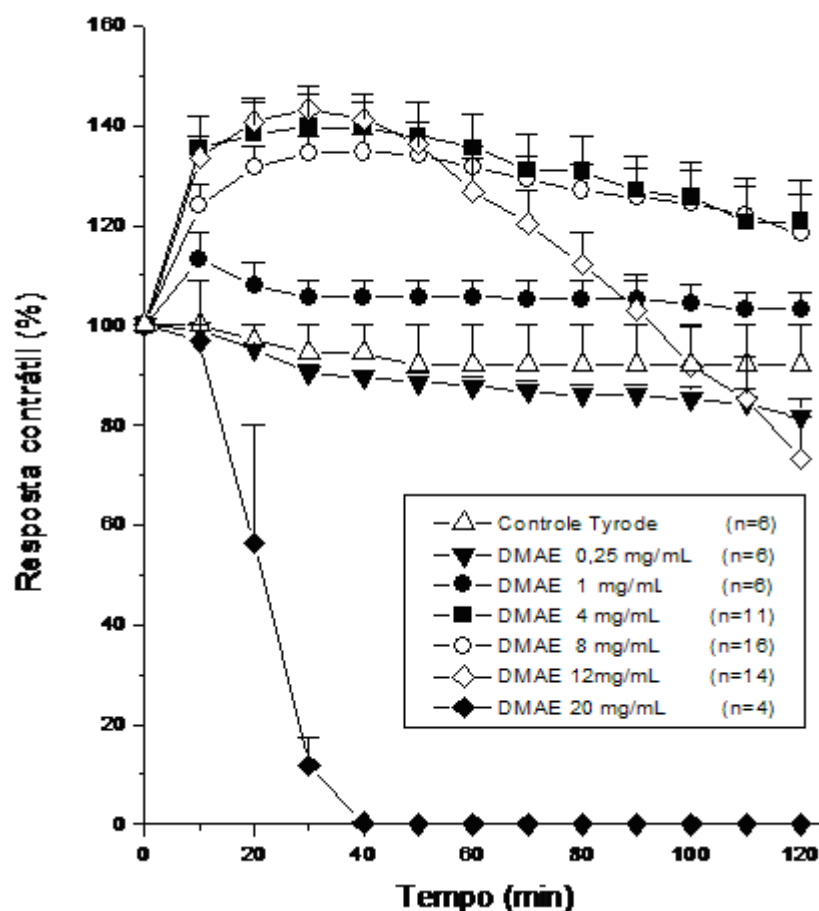


Figura 3- Curva concentração-resposta do DMAE — técnica miográfica, sob estímulo indireto. O número de experimentos está descrito na legenda da figura. *p < 0,05.

As preparações que foram curarizadas (d-Tc 10 µg/mL, n = 3, figura 4) e simultaneamente estimuladas, direta e indiretamente, responderam de forma clássica, conforme o esperado para este agente bloqueador não-despolarizante. A adição posterior de DMAE (8 mg/mL, n = 3) não reverteu o bloqueio induzido pela d-Tc, sob estímulo indireto, porém, após a lavagem da preparação houve recobro da resposta contrátil. De forma contrária, sob estímulo direto, a adição posterior de DMAE (8 mg/mL, n = 3) aumentou cerca de 30% a amplitude da resposta contrátil, assim permanecendo após a lavagem da preparação.

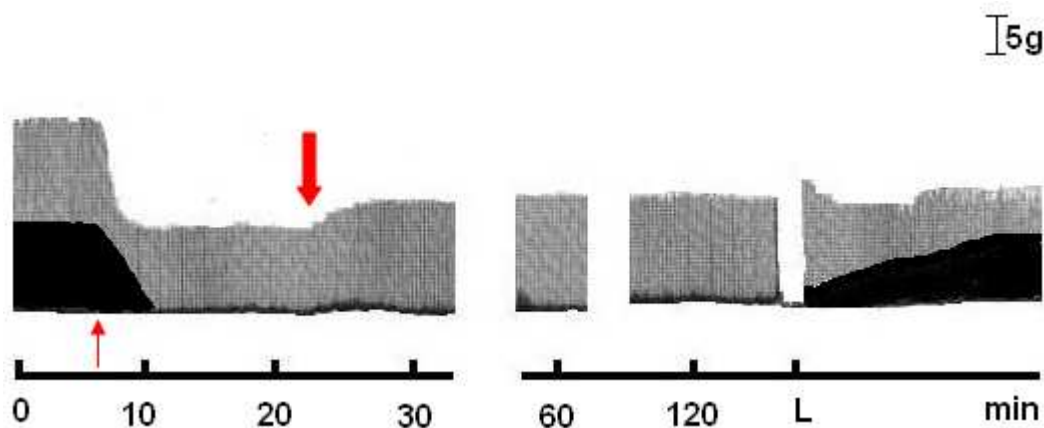


Figura 4- Preparação nervo-frênico diafragma de camundongos, sob estímulo direto e indireto. Registro miográfico representativo de ensaios em preparações previamente curarizadas (n=3). Seta delgada, momento de adição de d-Tubocurarina (10 μ g/mL) e decorrente bloqueio neuromuscular, sob estímulo indireto. Na vigência deste bloqueio, a estimulação direta garante a contração muscular e após 20 minutos adicionou-se DMAE (dimetilaminoetanol) 8mg/mL (seta espessa). L, lavagem da preparação e Barra de Calibração 5g/cm

4.2- Estudo eletrofisiológico

DMAE 1 mg/mL (n = 4) determinou o aumento do conteúdo quântico de potenciais de placa terminal de células controle, antes da adição de DMAE, de $196,7 \pm 32$ para, após a sua adição, em $281,9 \pm 67$ (tempos de 5 a 10 min; *p < 0,05 em relação ao controle) e $369,8 \pm 87$ (tempos de 30 a 60 min, *p < 0,05 em relação ao controle e também em relação ao tempo de 5 a 10 min), mostrando que a liberação quântica foi progressiva e mantida durante o período de observação (figura 5).

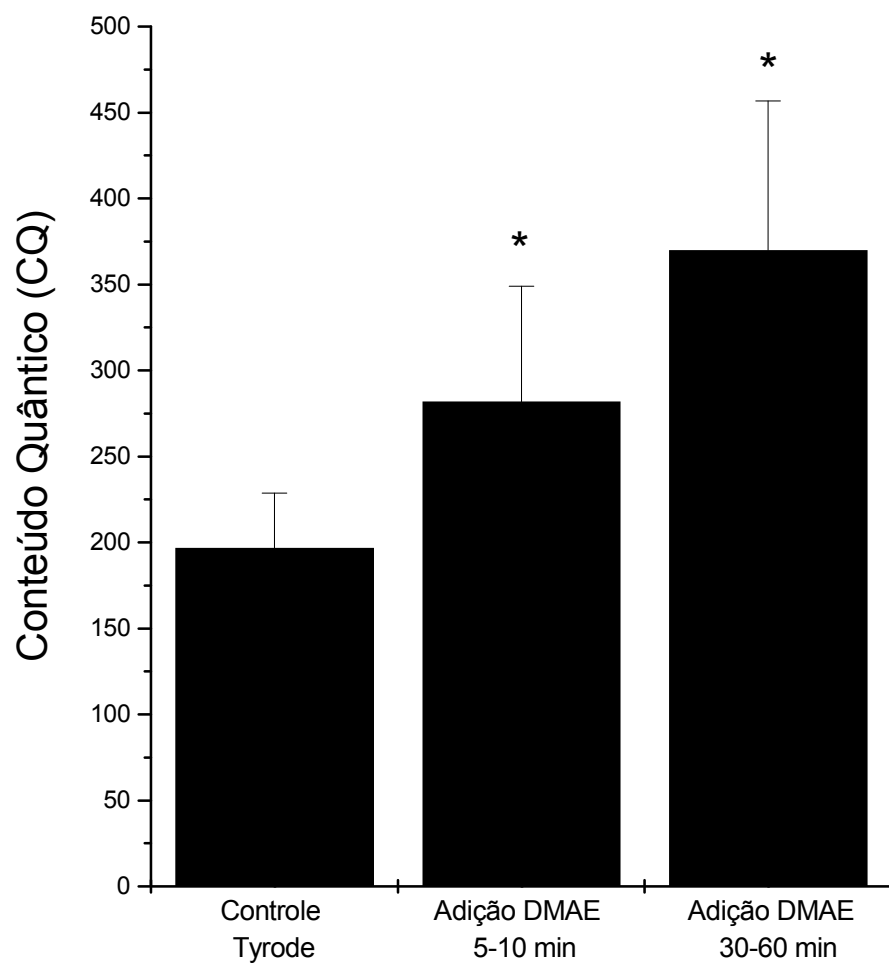


Figura 5- Determinação do conteúdo quântico em preparações nervo-frênico diafragma de camundongos (técnica eletrofisiológico), antes(controle) e após a adição de DMAE 1 mg/ML. *p > 0,05

5- DISCUSSÃO

Neste trabalho, enfocou-se a sinapse nervo-músculo (junção neuromuscular) por ser o modelo ideal, numa tentativa de melhor compreender e determinar o efeito tóxico do DMAE (e não o causado pelo seu uso oral). Este agente tem sido introduzido nas formulações cosméticas com a finalidade de combater a flacidez decorrente do processo de envelhecimento da pele.

O Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (Anvisa, 2002) preconiza alguns testes básicos úteis para qualquer substância usada em cosmético (absorção cutânea; estudo do potencial sistêmico – via oral e testes de mutagenicidade; estudo do potencial de efeitos alergênico e de risco irritativo – irritação primária da pele, da mucosa, ou ocular); bem como testes complementares úteis em situações particulares (toxicidade subaguda; estudo do efeito na reprodução; fotomutagenicidade; irritação por efeito cumulativo; teratogenicidade, carcinogenicidade e genotoxicidade). Neste estudo, utilizaram-se os parâmetros miográfico e eletrofisiológico para a avaliação de segurança do DMAE, sob o ponto de vista farmacológico.

Na condução deste estudo foram formuladas três hipóteses baseadas no seguinte raciocínio: se uma ação que aumente a força de contração muscular e que se contraponha à paralisia muscular é esperada do DMAE, então é possível que esse agente penetre as camadas mais profundas da pele (a derme) e, **(1)** tenha afinidade por terminações colinérgicas, seja aí recaptado como precursor da colina e aumente a síntese de acetilcolina (ACh), a exemplo do que ocorre no sistema nervoso central e periférico.

Ao ser deflagrado o impulso nervoso, muita ACh é liberada na fenda sináptica, desencadeando o processo contrátil, que passa a ser modulado pela quantidade de ACh (> quantidade de ACh, > força de contração). Por outro lado, pode-se pensar numa ação **(2)** envolvendo apenas a fibra muscular, como por exemplo, o receptor rianodina, que liberaria o cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático para o citoplasma da célula e desencadearia a contração

muscular. Pode-se, também, pensar no **(3)** envolvimento de ambos, o terminal nervoso e a fibra muscular.

Embora os parâmetros miográfico e eletrofisiológico não sejam preconizados pela ANVISA, esse modelo experimental respondeu às hipóteses levantadas. Dos efeitos farmacológicos mostrados pelo DMAE nos ensaios miográficos, a facilitação da neurotransmissão é o efeito desejado e não o bloqueio neuromuscular, que leva à paralisia da resposta contrátil. Assim, é importante conhecer o limite da ação farmacológica e pode-se afirmar que concentrações excessivas de DMAE provocam efeito contrário ao desejado, em preparações *in vitro*. Embora essa informação deva ser cuidadosamente extrapolada para a clínica, não pode ser desconsiderada. A facilitação da neurotransmissão, visualizada pelo aumento da amplitude da resposta contrátil, e que do ponto de vista fisiológico representa o aumento da força de contração, explicaria a sensação relatada de repuxamento da pele (efeito “lifting” do DMAE). O fato de a preparação responder aos estímulos evocados, após a lavagem da preparação, denota integridade funcional da resposta contrátil, mas estudos como o da análise morfológica ultra-estrutural poderia ser útil para avaliar a ocorrência ou não de algum tipo de dano à célula.

Na vigência do efeito da d-Tubocurarina (d-Tc), que induz um bloqueio neuromuscular por tornar a membrana sub-sináptica menos sensível à ação despolarizante da ACh e cuja interrupção na transmissão do impulso nervoso ocorre quando o neurotransmissor não pode mais originar um potencial de placa terminal, de amplitude suficiente para deflagrar a resposta propagada (Dale et al., 1936), o DMAE aumentou a amplitude da contração muscular sob estímulo direto, evidenciando uma ação direta sobre a fibra muscular (justificando, mais uma vez, o efeito “lifting”). Contudo, esse agente na concentração utilizada não reverteu o bloqueio induzido pela d-Tc, sob estímulo indireto, demonstrando não possuir ação anticolinesterásica, pois se a enzima acetilcolinesterase fosse inibida, haveria aumento da concentração de ACh na fenda sináptica, que por sua vez,

deslocaria a d-Tc dos receptores nicotínicos e reverteria, em algum grau, o bloqueio neuromuscular.

Se do ponto de vista analítico a técnica miográfica oferece informações de triagem sobre o fenômeno fisiológico da contração muscular, a técnica eletrofisiológica informa sobre a neurotransmissão, graças à obtenção de biopotenciais elétricos. O parâmetro eletrofisiológico obtido nesse trabalho, o potencial de placa terminal (PPT), representa o potencial pós-sináptico excitatório na célula muscular, que é desencadeante do potencial de ação muscular (Kandel et al., 1997). Se esse potencial de ação na fibra muscular se propagar, ocorrerá a contração muscular inviabilizando a inserção do microeletrodo de vidro. Por esta razão, utilizou-se uma fina tira da preparação nervo frênico-diafragma (“cut muscle”) para impedir a propagação do potencial e conseqüente contração muscular. Dessa forma, isolou-se para estudo o potencial de placa terminal, que permitiu a determinação do conteúdo quântico, uma vez que os PPTs representam as múltiplas liberações simultâneas de quanta de ACh (Del Castillo e Katz ,1954).

Os valores de conteúdo quântico, após a adição de DMAE à preparação, aumentaram gradativamente, mostrando claramente o envolvimento do terminal nervoso, ou seja, um evento pré-sináptico. Essa é uma informação interessante e que tem impacto sobre o uso concomitante de outro agente terapêutico, que também tem sido utilizado com fins cosméticos, o Botox®, proveniente da toxina botulínica produzida pela bactéria *Clostridium botulinum*, cuja ação de clivar proteínas presentes no terminal nervoso e impedir a liberação de ACh (Gundersen,1980; Simpson,1980) é contrária à ação do DMAE, que conforme resultados aqui mostrados, aumenta a liberação deste neurotransmissor em baixas concentrações.

6- CONCLUSÃO

Avaliando-se os resultados em conjunto, conclui-se que o DMAE age tanto sobre o terminal nervoso colinérgico, aumentando a liberação quântica do neurotransmissor e quanto sobre a fibra muscular (por mecanismo que permanece não esclarecido), aumentando a força de contração muscular; esse efeito é progressivo e dependente da concentração, que, quando elevada pode determinar a paralisia muscular, pelo menos observadas em condições *in vitro*.

A importância deste estudo é mostrar que o DMAE tem uma ação além-cosmética, ou seja, é um produto bioativo, que exerce efeitos sobre o organismo. Produtos cosméticos contendo ingredientes bioativos, com reconhecido mecanismo molecular, têm sido informalmente denominados cosmecêuticos, ou seja, cosméticos com propriedades terapêuticas, de combate a doenças ou curativas (Kanga, 2004).

Segundo a legislação brasileira (Lei 6.360/76, que dispõe sobre a vigilância sanitária dos produtos) (Riopharma, 2005), que abrange "medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos, correlatos, saneantes domissanitários, cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes", somente são registrados "cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal", aqueles que se destinem ao uso externo com finalidades estética, protetora, higiênica ou odorífera, sem causar irritações à pele ou danos à saúde. Incluem-se, portanto, como cosméticos, os "produtos para uso externo, destinado à proteção, embelezamento das diferentes partes do corpo"; produtos de higiene como aqueles "para uso externo, anti-sépticos ou não, destinados ao asseio ou desinfecção corporal" e perfumes como "produtos de composição aromática obtida à base de substâncias naturais ou sintéticas com a finalidade de perfumar".

Embora o termo cosmecêutico não seja reconhecido pelo FDA, tampouco pela ANVISA, há que se considerar as diferenças entre um produto meramente cosmético daquele que age como medicamento, como o DMAE (ou Botox®), e, portanto, deve-se assegurar a sua prescrição por dermatologistas e manipulação por profissionais farmacêuticos com habilitação na área.

O uso racional do DMAE deve ser avaliado pelo prescritor, uma vez que esse tipo de informação é geralmente inacessível à população, que busca tão somente uma melhor apresentação estética. Finalmente, sugere-se que mais estudos científicos que contribuam com a dermatologia especificamente na área da cosmetologia sejam incentivados, pois a proporção de substâncias químicas presentes em uma única formulação cosmética é muito grande, aumentando possíveis interações químicas e a ocorrência de eventos inesperados.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito antienvelhecimento do dimetilaminoetanol seria uma somatória de ações. Neste trabalho (uma hipótese neuronal) foi constatado que o DMAE interage com os terminais nervosos colinérgicos e também sobre a fibra muscular - efeitos que poderão ocorrer com o uso crônico de DMAE, que depende inicialmente de absorção cutânea para atingir os terminais e as fibras musculares. Além disso, o próprio DMAE, possui características químicas estruturais suficientes para se ligar ao receptor nicotínico, desencadear o potencial de ação, e não ser removido da fenda pela acetilcolinesterase (fato que pode explicar o bloqueio do DMAE em altas concentrações).

Grosman (2005) sugere que o DMAE aumente a concentração de acetilcolina na derme e epiderme, embora nenhum estudo comprobatório fosse realizado. Trabalhos de Grando (1997) com receptores nicotínicos de superfície de queratinócitos (células da epiderme), demonstraram que a ligação de acetilcolina nestes receptores promove o aumento da liberação de Ca^{2+} , óxido nítrico, prostaciclina, citocinas e fatores de crescimento de receptores muscarínicos. A ativação dos receptores de acetilcolina nos melanócitos (célula da epiderme) pode promover a mobilização de cálcio intracelular (Buchli et al., 2001). Em fibroblastos, a ligação de acetilcolina nos receptores nicotínicos, medeia processos como diferenciação e crescimento (Buchli et al., 2001). A ativação desses receptores celulares poderia promover o efeito rejuvenescedor do DMAE.

Mas, para promoção dos efeitos mediados pelo aumento da concentração de ACh nos órgãos alvo (epiderme e derme), é necessário ocorrer a absorção cutânea do dimetilaminoetanol. De acordo com o Textbook of Cosmetic Dermatology (2004), o efeito tensor imediato do DMAE é mais rápido do que sua própria absorção. Sete horas são requeridas para que traços de DMAE penetrem na pele. Seria impossível a ativação de receptores celulares em curto espaço de tempo, somente com o uso contínuo da fórmula.

Um mecanismo não - neuronal (sem o envolvimento da acetilcolina) pode ser responsável pelo efeito imediato. Um grupo de canadenses, Morissette et al. (2007) concluiu que o efeito antirugas do DMAE está relacionado

com a promoção de vacúolos nas células da pele. Essa citopatologia vacuolar pode estar relacionada com o efeito de melhor aparência, pois aumenta a espessura da epiderme. Porém, com consequências: interrupção da mitose, inibição das vias secretoras pela administração tópica de DMAE.

Considerando todas as pesquisas realizadas, até o momento, pode-se pensar que primariamente ocorra o efeito antirugas sem o envolvimento da acetilcolina (Morissete et al, 2007). Cronicamente, com a absorção cutânea do dimetilaminoetanol, tenha ação sobre a derme e epiderme (Grando, 1997; Buchli et al., 2001; Grosman, 2005) e finalmente, com o envolvimento dos terminais nervosos colinérgicos e das fibras musculares (Rocha-Junior et al., 2007).

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília: ANVISA; 2002. 43p. [acesso em 12 de nov de 2003]. Disponível em: URL: [http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).

Banker BQ, Kelly SS, Robbins N. Neuromuscular transmission and correlative morpholy in young and old mice. J Physiol 1983;339:355-75.

Baran R, Maibach, HI. The Textbook of Cosmetic Dermatology. 3th ed. London: Martin Dunitz, 2004.

Barstad JA, Lilleheil G. Transversaly cut diaphragm preparation from rat. An adjuvant tool in the study of the physiology and pharmacology of the myoneural junction. Arch Int Pharmacodyn Ther 1968; 175(2):373-90.

Bülbring E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. Br J Pharmac 1946; 1:38-61.

Buchli R, Ndoeye A, Rodrigues JG, Zia S, Webber RJ, Grando SA. Human skin fibroblasts express m2, m4 and m5 subtypes of muscarinic acethylcholine receptor. J Cell Biochem 1999; 74(2):264-77.

Buchli R, Ndoeye A, Arredondo J, Webber RJ, Grando SA. Identification and characterization of muscarinic acethylcholine receptors subtypes expressed in human skin melanocytes. Mol Cell Biochem 2001; 228(1-2): 57-72.

Dale HH, Feldberg W, Vogt M. Release of acetylcholine at voluntary motor nerve-endings. J Physiol 1936; 86(4):353-80.

Del Castillo J, Katz B. Quantal components of the end-plate potential. J Physiol 1954; 124(3):560-73.

Eckernäs SA, Aquilonius SM, Sahlstrom L. Effect of choline (Ch) and dimethylaminoethanol (DMAE) on atropine induced increase in locomotor activity in the rat. XV Scandinavian Congress of Physiology and Pharmacology 1976; supl. 440.

Fatt P, Katz B. An analysis of the end-plate potential with an intracellular electrode. *J Physiol* 1951; 115(3):320-70.

Fisher MC, Zeisel SH, Mar MH, Sadler TW. Inhibitors of choline uptake and metabolism cause developmental abnormalities in neurulating mouse embryos. *Teratology* 2001; 64(2): 114-22.

Fisher MC, Zeisel SH, Mar MH, Sadler TW. Perturbations in choline metabolism cause neural tube defects in mouse embryos in vitro. *FASEB J* 2002; 16(6):619-21.

Grando SA. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors . *J invest Dermatol Symp Proc* 1997;2:41-8.

Gragnani A, Giannoccaro FB, Sobral CS, França JP, Ferreira ML. Dimethylaminoethanol affects the viability of human cultured fibroblasts. *Aesth Plast Surg* 2007;31(6):711-18.

Grossman R. The role of dimethylaminoethanol in cosmetic dermatology. *Am J Clin Dermatol* 2005;6(1):39-47.

Gundersen CB. The effects of botulinum toxin on the synthesis, storage and release of acetylcholine. *Prog Neurobiol* 1980; 14(2-3):99-119.

Haubrich DR, Gerber NH, Pflueger AB. Deanol affects choline metabolism in peripheral tissues of mice. *J Neurochem* 1981; 37(2):476-82.

Haug BA, Holzgraefe M. Orofacial and respiratory tardive dyskinesia: potential side effects of 2-dimethylaminoethanol (Deanol)? *Eur Neurol* 1991; 31(6):423-5.

Jameson HD, Blacker HM, Fuchs ME. Hemiballismus-hemichorea treated with dimethylaminoethanol. *Dis Nerv Syst* 1977; 38(11):931-2.

Kanga V. Novos ingredientes cosméticos ativos. [on -line]. [acesso em 12 de nov. 2005]. Disponível em <http://www.happi.com/LatinAmerica/Portuguese/Fall041.htm>.

Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM. Fundamentos da Neurociência e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ; 1997.

Lewis JA, Young R. Deanol and methylphenidate in minimal brain dysfunction. Clin Pharmacol Ther 1975; 17(5):534-40. .

Martindale W, Reynolds JEF. The extra pharmacopoeia. 30th ed. London: Pharmaceutical Press, 1993.

Morrisette G, Germain L , Marceau F. The antiwrinkle effect of topical concentrated 2-dimethylaminoethanol involves a vacuolar cytopathology. Br J Dermatol 2007; 156(3):433-9.

Oshima-Franco Y, Leite GB, Dal Belo CA, Hyslop S, Prado-Franceschi J, Cintra ACO, et al. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. Basic Clin. Pharmacol Toxicol 2004; 95(4): 175-82.

Perricone M. O fim das rugas: um método natural e definitivo para evitar o envelhecimento da pele. Rio de Janeiro: Editora Campus, 2001.

Pfeiffer CC, Jenney EH, Gallagher W, Smith RP, Bevan WJr, Killam KF, et al. Stimulant effect of 2-dimethylaminoethanol – possible precursor of brain acetylcholine. Science 1957; 126(3274): 610-1

Revista Riopharma. Cosmecêuticos e sua trajetória no Brasil. [on-line]. Rio de Janeiro, RJ; Jul/Ago 2005. [acessado em 30 out. 2006]. Disponível em <http://www.crf-rj.org.br/crf/revista/67/13.asp?n=index.asp>

Rocha-Junior DS, Leite GB, Patini JB, Simioni LR, Oshima-Franco, Y. Saúde em Revista 2007, 9: 59-68.

Rotta NT, Guardioli A. Distúrbios de aprendizagem. In: Diamant A, Cypel S., editors. Neurologia Infantil. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1062-75.

Schuberth J, Ceder G. Pharmacological, biochemical and clinical effects of 2-dimethylaminoethanol (Deanol): a critical review. *Acta Pharmacol Toxicol* 1977; 41 Suppl 4:1-83.

Simpson GM, Voitashevsky A, Young MA, Lee JH. Deanol in the treatment of tardive dyskinesia. *Psychopharmacology (Berl)* 1977; 52(3):257-61.

Simpson LL. Kinetic studies on the interaction between botulinum toxin type A and the cholinergic neuromuscular junction. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 212:16-21.

Tammenmaa I, Mcgrath JJ, Sailas E, Soares-Weiser K. Cholinergic medication for neuroleptic-induced tardive dyskinesia. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 3:CD000207.

Uhoda I, Faska N, Robert C, Cauwenbergh G, Piérard GE. Split face study on the cutaneous tensile effect of 2-dimethylaminoethanol (deanol) gel. *Skin Res Technol* 2002; 8(3):164-7.

Windholz M, Budavari S, Merck & Co. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 10th ed. Rahway NJ: Merck & Co., 1983.