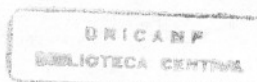


CHÁRISTON ANDRÉ DAL BELO

**ESTUDO DOS EFEITOS INDUZIDOS
PELA PREDNISOLONA
SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR**

Orientadora: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Campinas
2000



200015947

CHÁRISTON ANDRÉ DAL BELO

**ESTUDO DOS EFEITOS INDUZIDOS
PELA PREDNISOLONA
SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR**

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

Orientadora: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Campinas
2000

UNIDADE BC
 CHAMADA:
UNICAMP
19152
 Ex.
 OMBO BC/42794
 ROC. 16-278100
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 19/10/00
 N.º CPO

CM-00147226-5

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

D15e

Dal Belo, Cháriston André

Estudo dos efeitos induzidos pela prednisolona sobre a junção neuromuscular / Cháriston André Dal Belo. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : Léa Rodrigues Simioni

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glicocorticóides. 2. Eletrofisiologia. 3. Ratos. I. Léa Rodrigues Simioni. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

gene animal de laboratório
84. Comandante



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:

1. Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

2. Prof. Dr. José Carlos Cogo

3. Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

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

Data: 05/07/2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

DEDICATÓRIA

A DEUS !

***A meus pais, pelo presente da
vida.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me dado a vida.

A meus pais, por seu amor e compreensão, sem os quais este trabalho nunca seria concretizado.

Aos meus avós, a meu irmão Charles e à Maira, minha namorada, pelo amparo demonstrado nas horas difíceis.

À Profa. Dra. Léa Rodrigues-Simioni, pela orientação e por levar-me ao crescimento pelo caminho da liberdade e da confiança.

A Gildo B. Leite, pelo apoio técnico, pela amizade e companheirismo tão importantes para a realização deste trabalho.

À Yoko, por sua amizade inestimável, por ser tão prestativa nas horas mais difíceis e por suas atitudes e conselhos que me proporcionaram valioso crescimento pessoal e profissional.

À Carol, pela paciência e dedicação de amiga na socialização de seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, pela amizade e por ter cedido gentilmente sua aparelhagem eletrofisiológica, dando-me todo apoio e respaldo necessários sem os quais este trabalho não teria sido concluído

Ao Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado, pelo incentivo à visão crítica, dedicação, amizade e valiosas sugestões durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela confiança, respeito e valiosa contribuição para minha formação.

Ao Prof. Dr. Heitor Moreno Jr., por ceder gentilmente seus computadores para a realização de análises estatísticas.

À Dra. Júlia Prado Franceschi, pela inestimável ajuda e aconselhamento demonstrados durante o curso.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela valiosa colaboração na tradução e conversão de textos em inglês.

Ao Toninho, pelo apoio técnico na montagem dos experimentos e por sua amizade e companheirismo.

Ao Marquinhos do Depto. de Farmacologia da USP de Ribeirão Preto, pela amizade e ajuda na montagem de experimentos.

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia que contribuíram para a minha formação.

A todos os alunos do Curso de Pós-Graduação e aos funcionários do Departamento de Farmacologia, pela convivência madura e respeitosa que tivemos.

À seção de Apoio Didático, Científico e Computacional da Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, pelos serviços prestados.

Ao CNPQ e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

"Quando existe a convicção de que está havendo um avanço diário, mesmo que se de um passo apenas, pode-se sentir pela vida uma razão de viver, iluminada pela esperança de vencer."

M. Tamiguchi

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Glândulas supra-renais	1
1.2. Esteróides corticossupra-renais	2
1.2.1. Química e bioquímica	2
1.2.2. Funções biológicas	7
1.2.3. Ação neuromuscular	7
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Animais	21
3.2. Drogas usadas	21
3.3. Solução nutritiva	21
3.4. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (NFD)	22
3.4.1. Preparações incubadas com prednisolona	23
3.5. Preparação nervo ciático poplíteo externo-músculo tibial anterior (NPE)	24
3.5.1. Estudo com d-tubocurarina (d-Tc)	24

3.5.2. Estudo com prednisolona (P)	25
3.6. Estudo eletrofisiológico	25
3.6.1. Registro do potencial de membrana	26
3.6.2. Registro do potencial de placa terminal em miniatura	27
3.6.3. Análise Estatística	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo	29
4.1.1. Prednisolona (P)	29
4.1.2. d-Tubocurarina (d-Tc)	29
4.1.3. Prednisolona (P) + d-tubocurarina (d-Tc)	31
4.1.4. 3,4-Diaminopiridina (3,4-DAP)	31
4.1.5. Prednisolona (P) + 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP)	31
4.1.6. Guanidina (G) 2,5 mM	33
4.1.7. Prednisolona (P) - 0,3 mM + Guanidina (G)- 2,5 mM	33
4.1.8. Guanidina (G) - 5 mM	35
4.1.9. Prednisolona (P) - 0,3 mM + Guanidina (G) - 5mM	35
4.1.10. Guanidina (G) - 10 mM	37
4.1.11. Prednisolona (P) - 0,3 mM + Guanidina (G) -10 mM	37
4.1.12. β -Bungarotoxina (β -BuTx) - 0,15; 0,25 e 1 μ M	39
4.1.13. Prednisolona (P) - 0,3 mM + β -bungarotoxina (β -BuTx)	39

4.2. Preparação nervo ciático popliteo externo músculo tibial anterior (NPE)	45
4.3. Potenciais bioelétricos	47
4.3.1. Potencial de membrana (RP)	47
4.3.2. Potencial de placa terminal em miniatura (PPTM)	49
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	61
7. SUMMARY	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AChRs	Receptores para Acetilcolina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
β-BuTx	Beta-bungarotoxina
CRF	Fator de liberação de corticotropina
DFP	Diisopropilfluorofosfato
d-Tc	d-Tubocurarina
HC-3	Hemicolinio-3
NFD	Nervo frênico-diafragma
NPE	Nervo ciático poplíteo externo
PPTM	Potencial de placa terminal em miniatura
PR	Potencial de repouso
3,4-DAP	3,4-Diaminopiridina
V_{max}	Velocidade máxima

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Lista de Tabela

1	Frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura em diferentes tempos e tratamentos	51
----------	---	-----------

Lista de Figuras

Fig. 1	Biogênese dos hormônios corticosteróides	4
Fig. 2	A estrutura do núcleo corticosteróide e do cortisol	5
Fig. 3	Relações estruturais entre diversos corticosteróides	6
Fig. 4	Efeito da prednisolona (0,03 mM) sobre a amplitude da força de contração muscular	30
Fig. 5	Efeito da prednisolona (0,3 mM) sobre a força de contração muscular da preparação NFD	32
Fig. 6	Efeito protetor da prednisolona contra o bloqueio neuromuscular induzido pela d-Tc em preparação NFD	34

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Fig. 7	Respostas musculares produzidas por 3,4 DAP (10 mM) em preparações previamente incubadas ou não pela prednisolona (0,3 mM)	36
Fig. 8	Influência da prednisolona (0,3 mM) sobre a facilitação neuromuscular da guanidina (2,5 mM)	38
Fig. 9	Contrações musculares em preparações NFD tratadas com guanidina (5 mM) na ausência e presença de prednisolona (0,3 mM)	40
Fig.10	Bloqueio neuromuscular induzido pela guanidina (10 mM) em preparação NFD pré-tratada com prednisolona (0,3 mM)	41
Fig. 11	Respostas contráteis à β -BuTx em preparação NFD pré-incubada ou não com prednisolona	43
Fig. 12	Respostas contráteis à β -BuTx em preparação NFD pré-incubada ou não com prednisolona	44
Fig. 13	Registros da força de contração muscular em preparação NFD estimulada indiretamente e tratada com β -BuTx (1 μ M)	46
Fig.14	Efeito da prednisolona (400 μ g/kg) sobre o bloqueio neuromuscular produzido pela d-Tc (225 μ g/kg) em preparação NPE	49

Fig. 15	Efeito da prednisolona (0,03 mM) sobre o potencial de repouso da placa motora e fibra muscular em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo	50
Fig. 16	Ação da prednisolona (0,03 mM) sobre a amplitude e frequência dos pptm	52
Fig. 17	Efeitos induzidos pela prednisolona (0,3 mM) sobre a frequência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura	53
Fig. 18	Efeito induzido pela β -BuTx (1 μ M) sobre o pptm	54
Fig. 19	Ação da prednisolona (0,3 mM) + β -BuTx (1 μ M) sobre a frequência e amplitude dos pptm	55

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações induzidas pelo glicocorticóide prednisolona sobre os processos fisiológicos normais da junção neuromuscular de ratos e camundongos, através de técnica miográfica e eletrofisiológica *in vitro* e *in vivo*.

Prednisolona, na concentração de 0,3 mM, antagonizou os efeitos bloqueadores produzidos pela d-Tubocurarina (1,45 μ M) tanto *in vitro* como *in vivo*. Nesta mesma concentração, produziu um aumento na força de contração muscular induzida pela β -BuTx 1 μ M em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo e também alterou o padrão de resposta contrátil da guanidina. Além disso, Prednisolona causou efeitos pré-sinápticos como demonstrado pelo discreto aumento da frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura ($270 \pm 4\%$) além do aparecimento de potenciais gigantes. Contudo a prednisolona não determinou qualquer alteração sobre os valores do potencial de membrana. Assim, estes resultados confirmam os dados da literatura que apontam para uma indução por parte do glicocorticóide prednisolona, de efeitos diretos sobre a transmissão neuromuscular, possivelmente aumentando a liberação de acetilcolina no terminal nervoso motor.

¹1. INTRODUÇÃO

1.1. GLÂNDULAS SUPRARENAS

O significado fisiológico das supra-renais começou a ser apreciado quando *ADDISON (1855) descreveu a síndrome clínica decorrente da doença destrutiva das glândulas supra-renais. Suas observações despertaram o interesse do fisiologista **BROWN-SÉQUARD (1856) que realizou os primeiros experimentos sobre os efeitos da adrenalectomia e concluiu serem as glândulas supra-renais essenciais à vida.

As duas glândulas adrenais, cada uma delas pesando cerca de 4 g em humanos, situam-se nos pólos superiores dos rins, sendo que cada glândula é composta por duas partes distintas: a medula adrenal e o córtex adrenal. Dois tipos principais de hormônios adrenocorticais, os mineralocorticóides e os glicocorticóides são secretados pelo córtex adrenal. Além desses, são secretadas pequenas quantidades de hormônios sexuais, sobretudo homônios androgênicos.

Os glicocorticóides ganharam este nome porque exibem um efeito importante, aumentando a concentração de glicose sangüínea. Exercem

*ADDISON, - Haynes, R. C. Jr. *et al.* apud. - Hormônio adrenocorticotrópico, esteróides córtico-supra-renais e seus análogos sintéticos, inibidores da síntese e ações dos hormônios córtico-supra-renais. In: GILMAN, A. G.; NIES, A. S.; RALL, T. W.; TAYLOR, P. - **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p. 951-972.

** BROWN-SEQUARD, - apud GILMAN, A. G.; NIES, A.S.; RALL, T.W.; TAYLOR, P.- Hormônio adrenocorticotrópico, esteróides córtico-supra-renais e seus análogos sintéticos, inibidores da síntese e ações dos hormônios córtico-supra-renais. In: Haynes, R. C. Jr. - **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p 951-972.

também efeitos adicionais sobre o metabolismo protéico e sobre os lipídios, tão importantes para o funcionamento do corpo, quanto seus efeitos sobre o metabolismo de carboidratos, se não forem ainda mais importantes. Mais de 30 esteróides já foram isolados do córtex adrenal, mas apenas dois são de excepcional importância para a função endócrina normal do corpo humano: a aldosterona, que é o principal mineralocorticóide e o cortisol que é o principal glicocorticóide (GUYTON & HALL, 1997).

1.2. ESTERÓIDES CORTICOSUPRARENAIS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

1.2.1. Química e bioquímica

No organismo, a regulação da secreção de cortisol é realizada pelo hipotálamo e pela hipófise. No hipotálamo, em casos de necessidade, parcialmente dirigidos por impulsos nervosos, é liberada a corticoliberina (denominação antiga: "corticotropin releasing factor", CRF), um hormônio peptídeo, que estimula a adeno-hipófise à liberação de corticotropina. A corticotropina (hormônio adrenocorticotrópico, ACTH) estimula o córtex supra-renal para maior secreção hormonal. Como o córtex supra-renal não armazena hormônio, isto somente é possível por meio de um aumento da taxa de síntese. Entretanto, o cortisol circulante age sobre o hipotálamo e inibe a secreção de corticoliberina (= CRF). Com isto, reduz-se secundariamente a secreção

de corticotropina, deixando de existir a ação estimulante sobre o córtex supra-renal, mantendo-se assim, neste ciclo de regulação, um valor constante de liberação de cortisol. A auto-regulação, por meio do ciclo discutido acima depende de um ritmo de 24 horas, que é dirigido pelo eixo hipotálamo-hipofisário, sendo que a concentração plasmática de cortisol oscila entre 15-20 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, no momento máximo (6-9 horas da manhã) e aproximadamente 5 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, por ocasião do mínimo (por volta da meia-noite). A indução destes ritmos diários e a sua manutenção, ou seja, o funcionamento do relógio biológico, representam um problema ainda não solucionado da biologia molecular (KATZUNG, 1994).

A síntese destes hormônios ocorre pelas células do córtex a partir do colesterol, sendo este formado da acetil-coenzima A, passando pelo mevalonato, isopentenildifosfato e esqualeno. Nesse processo, primeiramente ocorre uma hidroxilação nos carbonos 20 e 22, que passam a 20,22-diidroxicolesterol, assim como a cisão desta ligação por meio de uma desmolase, que é a enzima marcapasso para a formação de hormônios esteróides, formando-se pregnenolona e daí progesterona, a qual sofre então uma hidroxilação enzimática seqüencial, formando vários hormônios corticosteróides (**Fig. 1**). Até esse ponto, a via sintética é idêntica para todos os esteróides, e as proporções relativas para todos os produtos finais, principalmente o cortisol, a aldosterona e os hormônios sexuais, são determinadas pelas atividades relativas das vias

subseqüentes. As perturbações da biossíntese podem ocorrer como defeitos congênitos, já que a atividade das enzimas envolvidas é determinada geneticamente.

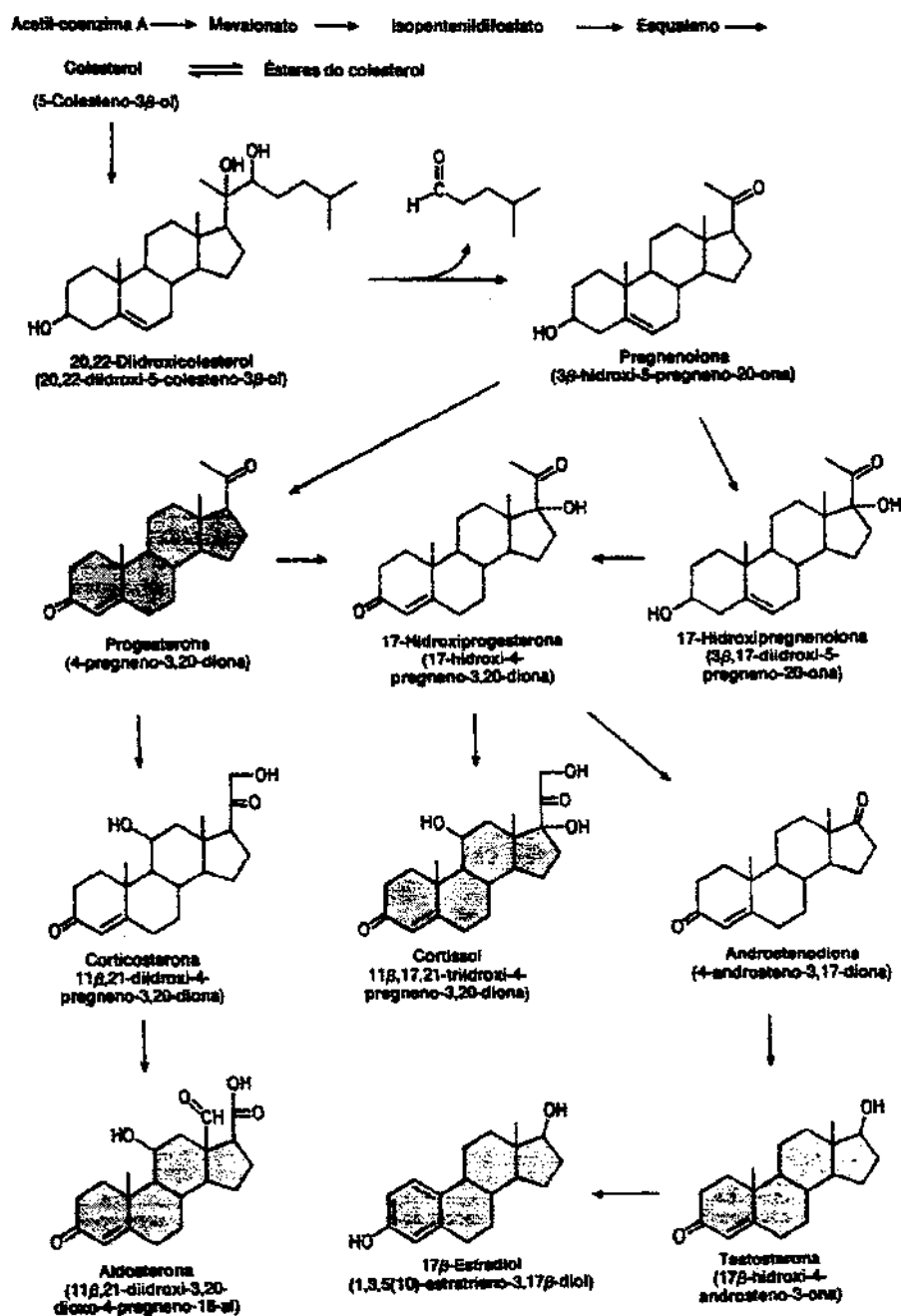


Fig.1- Biogênese dos hormônios corticosteróides (KATZUNG, 1994)

Deste modo, entre as principais características estruturais dos corticosteróides estão a presença de uma cadeia lateral de dois carbonos com junção na posição 17, representando os átomos de carbono 20 e 21, um grupo cetônico na posição 3 e uma dupla ligação entre os átomos de carbono 4 e 5. Os hormônios possuem também grupos metil angulares nas posições 10 e 13, representando os átomos de carbono 18 e 19 (Fig. 2). Os corticosteróides, por conseguinte, possuem ao todo 21 átomos de carbono (KARLSON, GEROK, GROSS, HOXTER 1992).

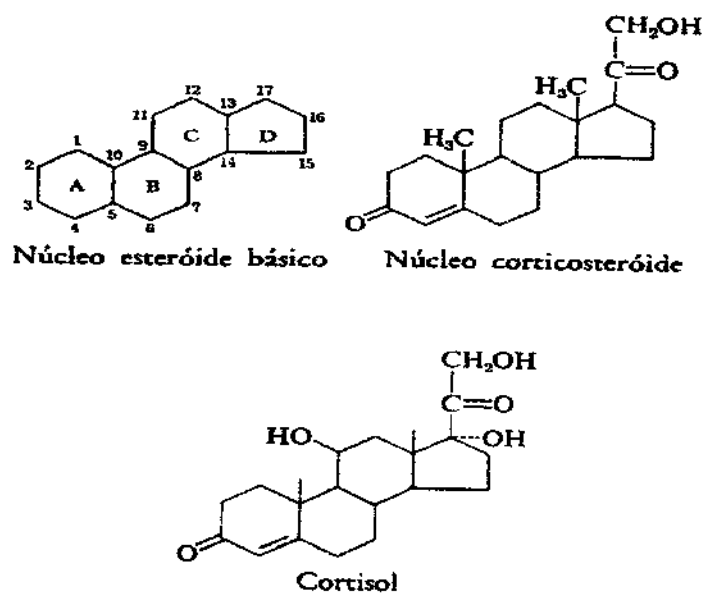


Fig. 2-A estrutura do núcleo corticosteróide e do cortisol (KARLSON *et al.*, 1992)

Dessa forma a hidrocortisona caracteriza-se por ser o protótipo dos glicocorticóides. Sua estrutura básica é a mesma para todos os esteróides, caracterizando-se pelo núcleo ciclopentanoperidrofenan-

treno. Alterações nas moléculas da hidrocortisona deram origem aos compostos glicocorticóides atuais (análogos sintéticos), mais potentes como antiinflamatórios e com menor capacidade de retenção de sódio (**Fig. 3**). O acréscimo de uma dupla ligação, por exemplo, entre os carbonos 1 e 2 da hidrocortisona e da cortisona originou, respectivamente a prednisolona e prednisona, ambas possuindo capacidade antiinflamatória quatro vezes maior que a hidrocortisona. Somando-se um grupo $-CH_3$ ao carbono 6 da prednisolona, temos a metilprednisolona (SILVA, 1989).

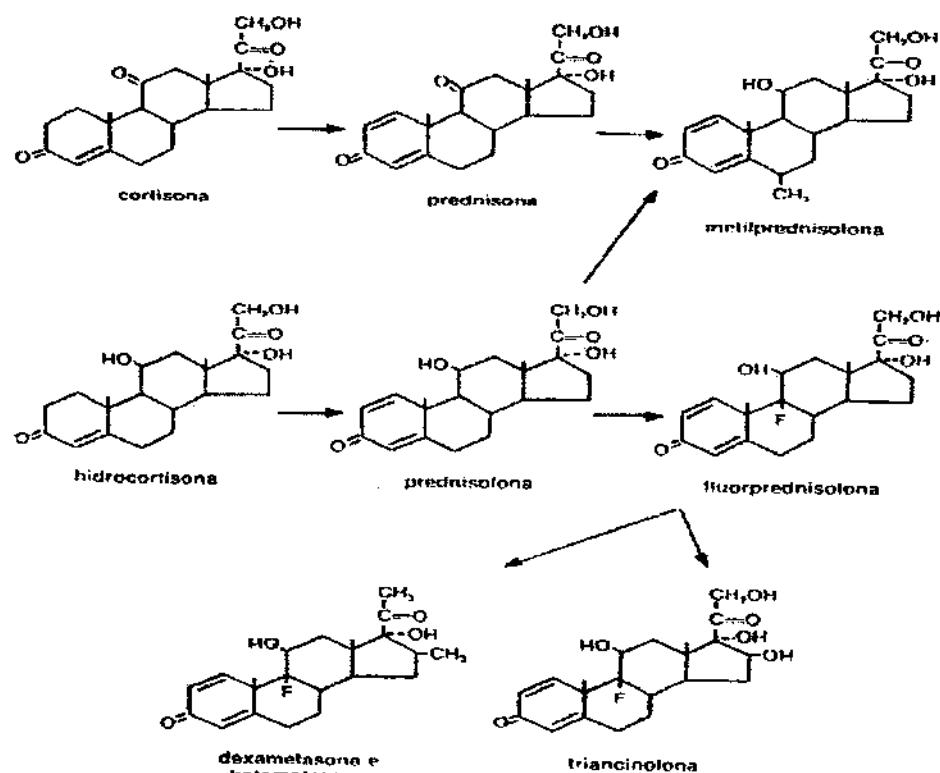


Fig. 3- Relações estruturais entre diversos corticosteróides (Silva, 1989)

1.2.2. Funções biológicas

A importância dos glicocorticóides não se restringe apenas ao metabolismo glicoprotéico. A manutenção do funcionamento normal da musculatura esquelética também exige concentrações adequadas de corticosteróides. É sabido que um dos mais destacados sinais da insuficiência córticossupra-renal consiste na redução da capacidade de trabalho do músculo. Em pacientes com a doença de Addison, essa menor capacidade de trabalho manifesta-se por fraqueza e fadiga. Além disso, os corticosteróides afetam o funcionamento do sistema nervoso central de várias maneiras indiretas, em particular, mantendo as concentrações normais de glicose no plasma, a circulação adequada e o conteúdo eletrolítico em equilíbrio (GUYTON & HALL, 1997).

1.2.3. Ação neuromuscular

Intimamente ligadas à produção fisiológica de corticosteróides e ao uso de glicocorticóides, estão também as doenças da placa mioneural. Várias anormalidades podem ocorrer na placa mioneural e, entre as mais comuns, estão a miastenia grave, a síndrome de Eaton-Lambert e alguns quadros miastênicos desencadeados por drogas. Dentre estas destaca-se a miastenia grave adquirida, uma enfermidade que se caracteriza por uma deterioração da transmissão neuromuscular em que o número de receptores para a acetilcolina nas placas terminais dos músculos miastênicos é reduzido. Além disso, anticorpos circulantes no

sangue destes pacientes, os quais ligam-se seletivamente aos receptores de acetilcolina, provocam a diminuição no número destes receptores. Assim, a miastenia grave possui um grande número de características de uma doença auto-imune, na qual pelo menos uma parte do defeito da transmissão neuromuscular é localizado pós-sinapticamente. Além disso, alguns pesquisadores têm demonstrado que, em músculos miastênicos e em diafragmas de ratos imunizados com proteína do receptor de acetilcolina purificada do *Torpedo*, existem alterações no conteúdo vesicular e na liberação de acetilcolina. Além disso têm-se postulado que há um processo de adaptação na liberação do neurotransmissor, compensando a perda dos receptores de acetilcolina (ROBBINS, COTRAN, KUMAR, 1986). Contudo, o tratamento com glicocorticóides, em pacientes miastênicos com risco de vida, tornou seus quadros estabilizados rapidamente após seus efeitos serem relatados por WARMOLTS, ENGEL, WHITAKER em 1970.

Após a publicação destes relatos, muitos estudos foram realizados na tentativa de se elucidar o mecanismo de ação pelo qual os glicocorticóides agem beneficemente no tratamento da miastenia grave. Contudo, ainda existem grandes divergências a respeito de como atuam esses hormônios em doenças de caráter auto-imune como a miastenia grave.

O efeito benéfico dos glicocorticóides, observado no tratamento da miastenia grave (WARMOLTS & ENGEL, 1972), foi inicialmente

atribuído à sua capacidade imunossupressora (ENGEL & WARMOLTS, 1971). No entanto, um efeito direto sobre a junção neuromuscular sugerido por WILSON, WARD, JOHNS (1974), deve ser levado em consideração. De fato, sabe-se que a prednisolona, em concentrações de 0,5 a 1 mM, causa um aumento na freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm) no diafragma de rato (ENGEL, 1976).

No entanto, foram feitos testes *in vitro* sobre a ação da prednisolona em relação à resposta nervosa e à contração muscular. Examinaram-se a taxa de decaimento do tétano, a amplitude e a freqüência do potencial de placa terminal em miniatura, e o bloqueio induzido pelo curare, hemicolinio e excesso de magnésio. Numa concentração de 0,1 mM, o esteróide não mostrou ação descurarizante e a probabilidade de aumento da liberação do neurotransmissor também não foi evidenciada. Além disso, quando os estoques de acetilcolina foram depletados pelo hemicolinio, não houve evidência de reparo pelo esteróide. Estes resultados levaram a se acreditar que a prednisolona e seus congêneres não exibem eficácia terapêutica na miastenia grave por ação direta na junção neuromuscular. Assim, concluiu-se que o benefícios clínicos dos esteróides são de ordem sistêmica, possivelmente por seus efeitos imunossupressores (HOFMANN, 1977).

Sabemos que a remoção de neurotransmissor da fenda sináptica, após sua liberação é um processo finamente orquestrado. Assim, nos terminais neuronais, existe a reabsorção de alta afinidade, mediada por

proteínas transportadoras e também por células gliais. Mecanismo como este foi descrito para norepinefrina, dopamina, serotonina, glutamato, GABA, glicina e colina. Os transportadores de neurotransmissores dependem de antiporte iônico, geralmente Na^+ , e operam com consumo de ATP. Tal sistema é capaz de recapturar mais de 50% da colina proveniente da hidrólise do neurotransmissor liberado pelos impulsos nervosos, é saturável e inibido competitivamente por drogas estruturalmente relacionadas com a colina, tais como o hemicolinio e a trietilcolina (POLLI-LOPES, ROSA, BELEBONI, PEREIRA, de VASCONCELOS, MOREIRA, 1999)

Nesse sentido, maiores evidências de que glicocorticóides atuam de maneira direta na junção neuromuscular vieram dos experimentos de WOLTERS, LEEUWIN, VAN WIJNGARDEN (1974), WOLTERS & LEEUWIN (1975), WOLTERS & LEEUWIN (1976), LEEUWIN & WOLTERS (1977) e LEEUWIN, VELDESEMA-CURRIE, WOLTERS (1978) segundo os quais a ação bloqueadora pré-sináptica do hemicolinio era antagonizada pela hidrocortisona, prednisolona e dexametasona *in vitro* bem como *in vivo*. VELDESEMA-CURRIE, WOLTERS, LEEUWIN (1976) mostraram que a prednisolona aumenta a taxa de racaptação de colina, bem como a taxa de incorporação de colina em acetilcolina no diafragma de rato *in vitro*. Juntando-se a estas informações, estudos realizados há mais de 30 anos, por TORDA & WOLFF (1952) mostraram que em ratos adrenalectomizados havia uma depressão da transmissão

neuromuscular, a qual era corrigida por hormônios adrenocorticotrópicos (ACTH) ou cortisona. Além disso, esta melhora foi acompanhada do aumento da produção de acetilcolina cerebral. Desde que estas primeiras investigações foram realizadas, tem-se observado que os glicocorticóides determinam o aumento da síntese de acetilcolina, atuando no aumento da taxa limitante de recaptação ativa da colina, pelo terminal nervoso colinérgico. Além disso RIKER, SASTRE, BAKER, ROTH, RIKER (1979), examinaram cuidadosamente a ação de glicocorticóides de alta afinidade sobre o aumento da recaptação de colina, em cérebro de gatos. Estes pesquisadores observaram que, em pequeno espaço de tempo a pré-administração de hidrocortisona ou triancinolona em gatos, aumenta a subsequente taxa de recaptação ativa de colina em sinaptossomas de 37% para 75%. Assim, mais especificamente, a velocidade máxima de transporte (V_{max}) da colina, dentro dos sinaptossomas, foi afetada, embora seja mantida a afinidade pelo carreador (transporte constante).

Três diferentes laboratórios têm documentado efeitos dos glicocorticóides na liberação espontânea de acetilcolina no terminal nervoso motor. Por exemplo, a incubação de prednisolona (1 mM) em preparação isolada nervo frênico-diafragma de rato durante 1 hora, determinou o aumento na frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm). Entretanto, este efeito do qual resulta a facilitação da liberação quântica de acetilcolina do terminal nervoso motor, ocorre

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

ao mesmo tempo em que diminui a amplitude dos potenciais de placa terminal (ppt). Além disso, a administração de maiores doses de glicocorticóides tem demonstrado ser capaz de melhorar a função neuromuscular, provavelmente devido ao seu possível efeito na síntese e liberação de ACh, por um aumento na sensibilidade de pelo menos alguns terminais nervosos motores, determinando a geração de descargas repetitivas. Em outras palavras, cada impulso nervoso atua, aumentando a probabilidade do terminal nervoso em descarregar repetitivamente e, por conseqüência, induzir tetania muscular em animais tratados com glicocorticóides (HALL, 1983).

Alguns trabalhos têm mostrado que os glicocorticóides realmente antagonizam, especificamente, a ação bloqueadora neuromuscular do hemicolinio-3 (HC-3) *in vivo* bem como *in vitro*. Observou-se que estes hormônios aumentam a DL₅₀ do HC-3 em ratos e camundongos. Finalmente, descobriu-se que os glicocorticóides antagonizam a inibição da taxa de recaptação de colina e a incorporação de colina em acetilcolina provocada pelo HC-3, na região rica da placa terminal no diafragma de rato *in vitro*. Conseqüentemente, presumiu-se que os corticosteróides possuem um efeito pré-sináptico direto o qual poderia explicar, pelo menos em parte, o efeito benéfico destes hormônios em pacientes miastênicos. Além disso, sugeriu-se que o conteúdo e a liberação de acetilcolina alterados, descobertos em músculos miastênicos, poderiam ser afetados por corticosteróides através do

sistema carreador de colina (LEEUWIN, VELDESEMA-CURRIE, WOLTERS 1981).

ARTS & OOSTERHUIS (1975) relataram que os glicocorticóides antagonizaram a ação bloqueadora neuromuscular da d-Tc *in vivo*, o que poderia indicar um efeito pós-sináptico dos mesmos na junção neuromuscular. Além disso, em estudos realizados com pancurônio, um composto biquaternário de amônio com um núcleo esteróide e que produz um bloqueio neuromuscular não despolarizante, caracterizado pelo "fade" tetânico na facilitação pós-tetânica, foi observado uma aparente reversão do bloqueio neuromuscular, induzido por esta droga, relatada após injeção intravenosa de hidrocortisona (MEYERS, 1977).

Por outro lado, em experimentos realizados por DURANT, BRISCOE, KATZ (1984), a administração aguda de hidrocortisona intravenosamente intensificou em 50%, o bloqueio da contração muscular na preparação músculo tibial anterior e no músculo sóleus de gato, produzido pela infusão intravenosa constante de pancurônio. Mas o tratamento crônico de gatos machos com hidrocortisona não exerceu efeito sobre a sensibilidade ao pancurônio de ambos os músculos tibial anterior e sóleus. Concluíram que a hidrocortisona pode aumentar o bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio e que o tratamento crônico com hidrocortisona pode modificar a resposta para a acetilcolina. Em ambos os casos, o monitoramento da junção neuromuscular, durante a anestesia, foi sugerido sempre que o paciente

receba altas doses de hidrocortisona ou esteja em tratamento crônico com este corticosteróide.

Em adição, experimentos mais recentes realizados por VELDESEMA-CURRIE, VAN WILGENBURG, LABRUYÈRE, LANGERMEIJER (1984) mostraram que, em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo incubada com dexametasona e prednisolona e moduladas pela β -Bungarotoxina, uma toxina de reconhecida ação pré-sináptica, ocorreu um aumento na frequência e amplitude dos ppts assim como um aumento da recaptação de colina e incorporação desta à acetilcolina, corroborando a hipótese de um sítio de ação pré-sináptico para esses hormônios.

Na mesma linha vêm as descobertas de DALKARA & ONUR (1987), que estudaram os efeitos da dexametasona, utilizando registros intra e extracelulares na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. Uma hora de perfusão com dexametasona (10^{-4} a 10^{-3} M) aumentou a frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura, bem como a amplitude dos potenciais de placa terminal e o conteúdo quântico, sugerindo um aumento na liberação de acetilcolina. Dexametasona também aumentou a potenciação e facilitação pré-sináptica durante estimulação nervosa repetitiva. Contudo, não houve alteração no potencial de membrana, mas aumentaram-se as amplitudes dos potenciais de placa terminal. Estas descobertas também corroboram a

idéia de que os glicocorticóides exerçam uma ação facilitatória direta na transmissão neuromuscular, por ação pré-sináptica.

Entretanto, pesquisas em clínica sobre o efeito da cortisona em pacientes com miastenia grave freqüentemente têm demonstrado uma piora da condição dos pacientes e uma refração, com o aumento das doses de inibidores de colinesterases, durante o período de administração do hormônio. O aumento na fraqueza, contudo, pode ser devido somente ao efeito da cortisona, mas uma possível interação adversa entre o esteróide e as drogas anticolinesterásicas aparentemente foi considerada (PATTEN, OLIVER, ENGEL, 1974).

Confirmando estes resultados, DENGLER, RUDEL, WARELAS, BIERNBERGER (1979) demonstraram que a prednisolona em doses de 12,5 a 90 mg/kg reduziu ou aboliu completamente a resposta contrátil de preparações nervo-músculo de rato tratadas com anticolinesterásicos. Estes efeitos também puderam ser comprovados por DURANT, BRISCOE, KATZ (1984), utilizando-se a preparação nervo ciático-tibial anterior de gato, tratada com hidrocortisona. Além destes, RIBERA & NASTUK (1988) demonstraram que, em músculos-controle, onde 3 µg de neostigmina ou 30 µg de piridostigmina, foram adicionadas ao banho, houve um aumento na despolarização em resposta à acetilcolina aplicada iontoforéticamente ou carbamilcolina. Os resultados com músculo de rã tratados com prednisolona foram essencialmente idênticos.

Entretanto, além das evidências que sugerem influência direta e adicional na transmissão neuromuscular pelos glicocorticóides (WILSON, WARD, JOHNS 1974), muitos estudos indicam que grandes doses de glicocorticóides causam um efeito inibitório direto na transmissão neuromuscular, representado por fraqueza muscular, em larga escala, com um aumento do desgaste muscular, cujo mecanismo ainda não é conhecido (HOFMANN, 1977; LEEUWIN *et al.*, 1981; RIGGS, 1982).

No entanto, como descrito por LEEUWIN & WOLTERS (1977), o efeito dos glicocorticóides na junção neuromuscular é dose-dependente. Iniciando-se com a menor dose efetiva, o efeito facilitador aumenta até que um ótimo é obtido. Entretanto se a dose é aumentada ainda mais, desaparece o efeito facilitador da transmissão que é substituído então, pelo efeito bloqueador neuromuscular.

Por outro lado, alterações morfológicas observadas, após o tratamento prolongado com hidrocortisona em animais normais, também sugerem uma ação direta dos corticosteróides na junção neuromuscular (DURANT *et al.* 1984). Em estudos realizados na transmissão neuromuscular de cães demonstrou-se que o tratamento prolongado, com grandes doses de prednisolona, produziu um leve grau de amplificação nas placas motoras terminais e um aumento da resistência na transmissão neuromuscular contra a ação bloqueadora da d-Tubocurarina (MOZAI, 1976). TUNCBAY, KETEL, BOSHES (1965)

demonstraram alterações morfológicas na placa motora terminal de coelhos tratados com acetato de cortisona. SHAPIRO, NAMBA, GROB (1968) demonstraram apreciáveis alterações hiperplásticas ou amplificação da área das placas motoras terminais em coelhos injetados com ACTH. Em "hamsters", esses hormônios causam um aumento de duração transitória na região juncional pós-sináptica (CHOKROVERTY, REYES, CHOKROVERTY, KAPLAN, 1978). Em ratos causam uma amplificação dos terminais nervosos, nas fibras musculares de contração lenta (FAHIM & ANDONIAM, 1990; FAHIM, 1995). Em culturas de neurônios retiniais com células musculares dissociadas de ratos neonatais, o tratamento com glicocorticóides aumentou a maturação do componente pré-sináptico do contato nervo-músculo (PURO, 1983). SIECK, VAN BALKON, PRAKASH, ZHAM, DEKHUIJZEN (1999) demonstraram que em fibras musculares de ratos injetados com prednisolona houve um aumento do diâmetro de algumas destas fibras musculares. Além disso, na junção neuromuscular de fibras musculares humanas em cultura, a hidrocortisona aumentou o número de receptores para acetilcolina (AChRs) de modo tempo-dependente (BRAUN, ASKANAS, ENGEL, IBRAHIM, 1993).

DRAKONTIDES (1982) demonstrou que o tempo para a degeneração dos terminais nervosos de ratos tratados com o glicocorticóide triancinolona, foi aumentado.

A ação farmacodinâmica dos corticosteróides na transmissão

neuromuscular foi investigada por BOUYARD, BALANSARD, EMELINA, JADO (1970) e NAMBA (1972). Os primeiros apresentaram uma figura, na qual demonstraram uma diferença não significativa em resposta à ação bloqueadora da d-Tubocurarina entre ratos injetados intraperitonalmente com prednisolona e os controles normais (MOZAI, 1976). Segundo ANDREW & CLAMANN (1988), a administração de glicocorticóide em músculos brancos rápidos, induz atrofia e fraqueza de maior intensidade do que em músculos vermelhos, mas a relação entre os efeitos esteróides e o tipo de unidade motora ainda não é conhecida.

Contudo, em experimentos realizados por VAN WILGENBURG, DJIE NJIO, BELLING, VAN DEN HOVEN (1982), verificou-se que o tamanho médio de uma vesícula sináptica nos terminais nervosos de diafragma isolado de rato foi significativamente aumentado após a incubação com o glicocorticóide prednisolona. O formato das vesículas foi também alterado, tornando-se arredondado. A amplitude dos potenciais em miniatura de placa terminal também foi significativamente aumentada em diafragmas de rato isolado, injetados com prednisolona e dexametasona. Concluiu-se que doses relativamente baixas de glicocorticóides exercem efeitos diretos na placa terminal motora, no diafragma de rato *in vitro* e *in vivo*.

Além disso, BAKER, RIKER, HALL (1977) demonstraram em preparação nervo ciático-tibial anterior de gato um aumento da

facilitação pós-tetânica, produzido com uma simples dose intravenosa de metilprednisolona.

Mais evidências de que glicocorticóides atuam diretamente na junção neuromuscular vieram dos experimentos realizados por BAKER, DRAKONTIDES, RIKER (1982). Estes pesquisadores observaram que em gatos que receberam uma injeção intravenosa de metilprednisolona (90 mg/kg), após a injeção de diisopropilfluorofosfato (DFP) nenhum sinal clínico de neuropatia induzida pelo organofosforado foi observada, em intervalos de 70 dias. A eletromicroscopia mostrou que a ultra-estrutura da junção neuromuscular estava normal. Assim, o regime por glicocorticóide protegeu gatos contra o efeito neurotóxico do envenenamento por organofosforados.

2. OBJETIVOS

Os efeitos induzidos por glicocorticóides sobre a fisiologia da transmissão neuromuscular vêm sendo objeto de numerosas pesquisas nos últimos anos, após o efeito benéfico produzido por estes hormônios no tratamento da miastenia grave ter sido relatado por WARMOLTZ *et al.* (1970).

A análise globalista desses trabalhos revela que esses hormônios atuam facilitando essa neurotransmissão, agindo, fundamentalmente, a nível pré-sináptico através de possível interferência no mecanismo de recaptação de colina pelo terminal nervoso motor (VELDESEMA-CURRIE *et al.*, 1984).

Face ao exposto, propusemo-nos reavaliar esse estudo no sentido de contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação desses compostos, em virtude do seu amplo emprego terapêutico em processos fisiopatológicos do sistema locomotor.

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Camundongos de ambos os sexos da linhagem Swiss, pesando entre 25 e 30 g e ratos machos da linhagem Wistar de peso variando entre 280 e 350 g. Todos os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp. Os animais foram alojados à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com livre acesso à ração (Purina®) e água.

3.2. DROGAS USADAS

- β -Bungarotoxina (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil)
- Cloreto de d-tubocurarina (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, S.P, Brasil).
- Cloreto de guanidina, (Serva, Heidelberg, Germany) .
- 3,4-Diaminopiridina, (Milwaukee, WI, E.U.A) .
- Hidrato de cloral (Quimibrás, São Paulo, SP, Brasil.)
- Pentobarbital sódico (Hypinol®; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil).
- Prednisolona, sob a forma de 21-acetato de metil prednisolona (Up-John do Brasil, São Paulo, S.P., Brasil).

3.3. SOLUÇÃO NUTRITIVA

Nos experimentos com a preparação nervo frênico-diafragma de

camundongo foi usado a solução de Tyrode com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e glicose.

3.4. PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO (NFD)

Camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com hidrato de cloral (3 mg/kg) e posteriormente exsanguinados. Após a dissecação para a retirada do hemidiafragma esquerdo e direito e isolamento dos nervos frênicos correspondentes (BÜLBRING, 1946), as preparações foram banhadas em solução nutritiva de Tyrode (pH 7,5) aerada (mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂; pH 7,5) à 37°C. Cada segmento do hemidiafragma foi fixado em uma cuba com capacidade para 5 ml, foi preenchida com solução nutritiva. O músculo diafragma foi mantido, por sua porção tendinosa, sob tensão constante de 5 g. O nervo frênico ficou sobreposto a um eletrodo de platina que se manteve em contato com a superfície da solução nutritiva. O transdutor isométrico (BG-50 g) foi acoplado a um fisiógrafo (Gould RS 3400). A preparação, então, foi estimulada indiretamente, através do nervo frênico (estimulador Grass S 48), usando-se estímulos supramaximais e frequência de 0,1 Hz com duração de 0,2 ms. Após o registro em

condições-controle e a verificação do perfeito estado da preparação, foram adicionadas drogas para a observação dos seus efeitos.

3.4.1. Preparações incubadas com prednisolona (P)

Todos os experimentos realizaram-se da seguinte forma: as preparações foram previamente incubadas com prednisolona (**P**) na concentração de 3 mM por um período de 15 a 30 min e, então, administramos *d*-Tubocurarina (**d-Tc**) na concentração de 1,45 μ M, Guanidina (**G**) nas concentrações de 2,5 mM, 5 mM e 10 mM, 3,4-Diaminopiridina (**3,4-DAP**) na concentração de 10 mM e β -bungarotoxina (**β -BuTX**) nas doses de 0, 15 μ M, 0,25 μ M e 1 μ M.

Também foram feitos experimentos em que as substâncias foram adicionadas às preparações isoladamente, e observados os efeitos por um período de 120 min, findo o qual, as preparações foram submetidas a três lavagens (W) sucessivas com solução nutritiva.

Todos os experimentos foram realizados, utilizando-se músculos contralaterais.

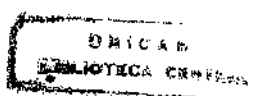
Experimentos-controle sem a adição de nenhuma droga também foram feitos. Nestes casos, adicionou-se apenas o volume correspondente de solução veículo (Tyrode).

3.5. PREPARAÇÃO NERVO CIÁTICO-POPLÍTEO EXTERNO-MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR (NPE)

Ratos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso corporal), foram submetidos à traqueostomia para possibilitar o uso da ventilação controlada mecânica que foi mantida, usando-se um respirador UGO BASILE (modelo 7025), padronizados para manter um volume corrente de 1,2 ml/kg de peso corporal e frequência respiratória de 70 movimentos por minuto. Após a dissecação e secção do tendão do músculo tibial anterior e do nervo ciático-poplíteo externo foi realizada a trepanação da tibia para a fixação do membro a uma base de cortiça (BROWN, 1938). O tendão do músculo foi conectado a um transdutor isométrico (BG-50 g) e este ao fisiógrafo (GOULD RS 3400). O coto distal do nervo ciático-poplíteo externo foi estimulado (estimulador GRASS S 48) utilizando-se estímulos supramaximais de 0,2 ms de duração e frequência de 0,5 Hz. Após o registro em condições-controle e a verificação do perfeito estado da preparação, ou seja, a manutenção da linha de base e amplitude das contrações musculares, as drogas foram injetadas no peritônio.

3.5.1. ESTUDO COM D-TUBOCURARINA (d-Tc)

Vários experimentos-piloto foram realizados com a d-Tc, até que se padronizasse a dose adequada e favorável ao estudo *in vivo* da prednisolona. Concluiu-se que d-Tc na dose de 225 µg/kg de peso



corporal, administrada pela via i.p, seria a dose ideal, pois proporcionou um bloqueio da força de contração do músculo tibial anterior em torno de 50% da amplitude-controle em 60 minutos de observação.

3.5.2. ESTUDO COM PREDNISOLONA (P)

A prednisolona foi injetada pela via i.p na dose de 400 µg/kg de peso corporal. Após a injeção, observou-se a preparação pelo período de uma hora, tempo suficiente para a sua distribuição e determinação de todos os seus efeitos. Nos experimentos em que a d-Tc foi utilizada, foi injetada 15 min após a injeção da prednisolona.

3.6. ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO

A preparação com sua face torácica voltada para cima (hemidiafragma esquerdo), foi fixada, horizontalmente, por meio de alfinetes entomológicos, em cuba revestida de resina e silicone, ("Dow Corning-Sylgard"). A cuba foi preenchida com 3 ml de solução de Tyrode de composição já descrita. A temperatura foi mantida a 30-34 °C com o auxílio de uma lâmpada de raios infravermelhos e a aeração feita com o borbulhamento de carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂). Para a observação dos parâmetros eletrofisiológicos, a cuba foi colocada na platina de microscópio estereoscópico (WILD M7 S-SWITZERLAND) com capacidade para aumentos de até 40 vezes.

Usou-se a técnica convencional de registro com microeletrodo (FATT & KATZ, 1951). Os microeletrodos de vidro, preparados com o auxílio do "Vertical Pipette Puller" (modelo 700 D-David Kopf Instruments; CA, USA), foram preenchidos com KCl 3 M, tendo uma resistência entre 8-30 MΩ). As micropipetas foram introduzidas intracelularmente (seis leituras em regiões distintas) sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio de micromanipulador "Leitz", para a medida do potencial de repouso (PR) e captação dos potenciais em miniatura de placa terminal (pptm). O eletrodo indiferente constituiu-se de um fio de platina incluído em tubo de vidro e submerso em mercúrio vivo, onde colocou-se um tubo curvo (para adaptação à cuba) preenchido com ágar-salina. O PR foi registrado "on line", usando-se microcomputador XT-DICOM com capacidade de registro para potencial de repouso, forma de onda dos potenciais, bem como as análises da amplitude e tempo para o pico dos potenciais evocados. Os pptm foram registrados em osciloscópio Tektronix e fotografados por câmera fotográfica POLAROID C-5C TEKTRONIX, ou em fisiógrafo GOULD RS 3400. A medida do PR foi feita na região das placas motoras e também, aleatoriamente, em regiões distantes destas.

3.6.1. REGISTRO DO POTENCIAL DE MEMBRANA

Nas experiências realizadas para avaliar o efeito da prednisolona sobre o potencial de membrana, esta foi utilizada, na concentração de

0,03 e 0,3 mM. A determinação do potencial de membrana (seis leituras) foi feita em regiões distintas da fibra muscular. Após a determinação da medida do potencial de membrana-controle, adicionou-se prednisolona ao banho e procedeu-se as leituras aos 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, na região das placas motoras em seis diferentes locais da fibra. O mesmo procedimento foi realizado para a β -bungarotoxina (1 μ M) e prednisolona mais β -BuTx.

3.6.2. REGISTRO DO POTENCIAL DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA (PPTM)

Os potenciais de placa terminal em miniatura foram captados através da inserção do microeletrodo nas fibras musculares, na região da placa motora. Nestes experimentos em que se estudou o efeito da prednisolona sobre a frequência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura, utilizou-se a prednisolona na dose de 0,3 mM. Os potenciais de placa terminal em miniatura foram então fotografados. Os parâmetros-controle foram definidos antes da adição da droga. Os pptm foram registados aos 5, 15, 30 e 60 min de incubação.

3.6.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o método ANOVA para medidas repetidas nos registros miográficos. O teste de comparação múltipla de Duncan foi utilizado

para o potencial de membrana. Para a medida do potencial de placa terminal em miniatura utilizamos o teste "t" de Student. Todos os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDO MIOGRÁFICO

4.1.1. PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO (NFD)

4.1.1.1. Prednisolona (P) - A incubação de preparações NFD de camundongo ($n = 6$) com a prednisolona na dose de 0,03 mM (Fig 4 **C**) não determinou qualquer mudança na amplitude da resposta contrátil, quando comparada com a preparação-controle (Fig. 4 **B**). Após três lavagens (L), as preparações mantiveram o mesmo padrão de resposta contrátil (Fig. 4 **A** e **C**). Resultado semelhante foi obtido usando-se prednisolona em dose 10 vezes maior (0,3 mM) (Fig. 5).

4.1.1.2. *d*-tubocurarina (*d*-Tc) - A adição de *d*-Tc (1,45 μ M) à preparação NFD de camundongo determinou um bloqueio neuromuscular da ordem de $50 \pm 7\%$ em 20 min ($n = 6$) (Fig. 6 **B**) e de $60 \pm 10\%$, ao final de 120 min de observação (Fig. 6 **A**). A lavagem das preparações resultou em uma recuperação de $80 \pm 5\%$ da resposta contrátil inicial (Fig. 6 **A** e **B**).

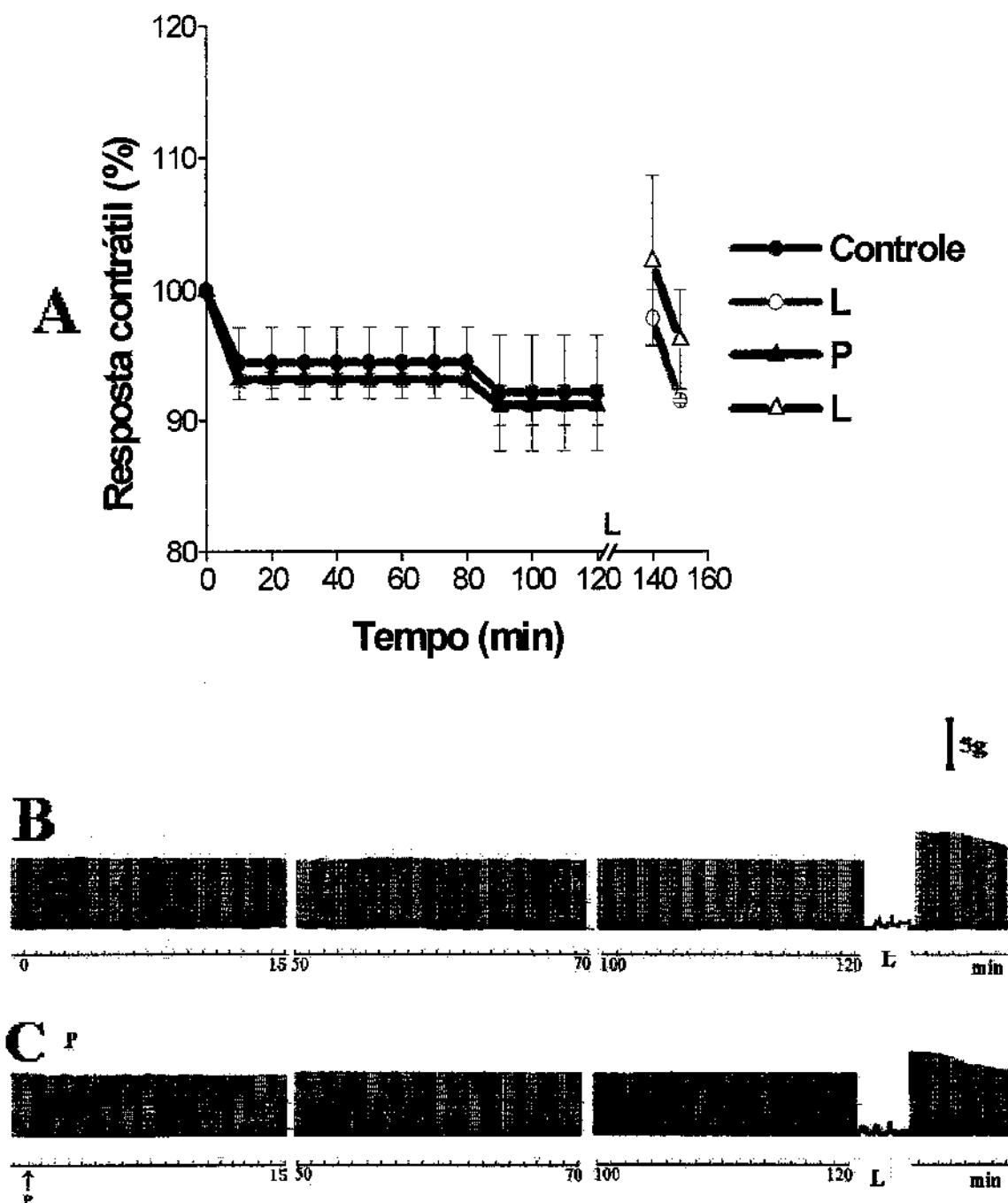


Fig. 4-Efeito da prednisolona (0,03 mM) sobre a amplitude da força de contração muscular. Note que a prednisolona não interfere com o padrão da resposta contrátil em relação ao controle. Em **A**, a média $\pm$ erro padrão e em **B** e **C**, traçados representativos com e sem prednisolona P: prednisolona; L: lavagem.

4.1.1.3. Prednisolona (P) + d-tubocurarina (d-Tc) - Como mostra a Fig. 6 - **A** e **C**, o pré-tratamento da preparação com prednisolona (0,3 mM, n = 6) reduziu em 70 % o bloqueio determinado por 1,45 μ M de d-Tc ($p \leq 0,01$, Fig. 6 **A**). Após 3 lavagens, ocorreu um retorno à amplitude controle (Fig. 6 **C** e **A**).

4.1.1.4. 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) - A incubação de preparações NFD de camundongo com 3,4-DAP (10 mM) (n = 6) determinou um aumento inicial da amplitude de contração muscular da ordem de $280 \pm 10\%$ aos 10 min (Fig. 7 **A**), seguido de leve redução e manutenção da amplitude de resposta ($230 \pm 9\%$), após 120 min de observação (Fig. 7 **B**). Após sucessivas lavagens (L), a amplitude de contração muscular ainda manteve-se acima dos valores controle ($250 \pm 10\%$) .

4.1.1.5. Prednisolona (P) + 3,4-Diaminopiridina (3,4 DAP) - A pré-incubação da preparação com a prednisolona (0,3 mM) não alterou de modo significativo o padrão de resposta da 3,4-DAP (10 mM, n = 6) ensaiada isoladamente (Fig 7 **A**).

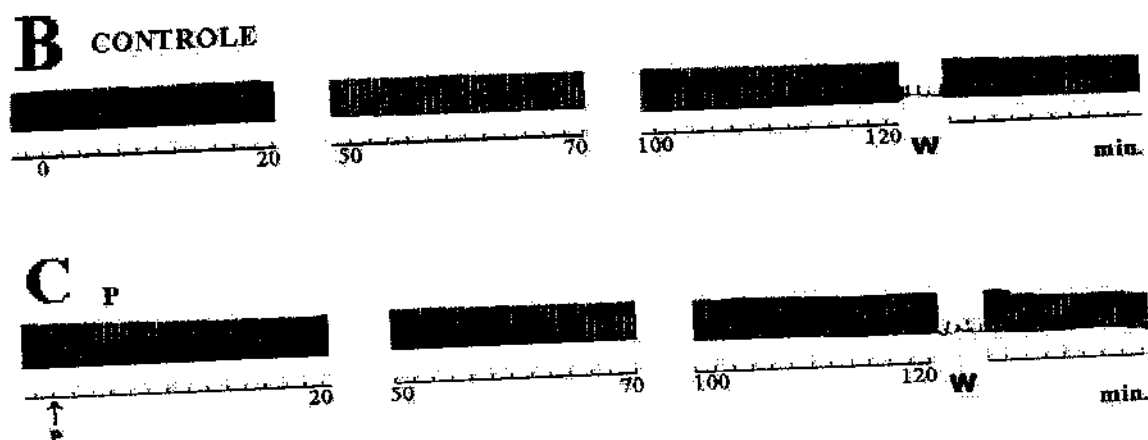
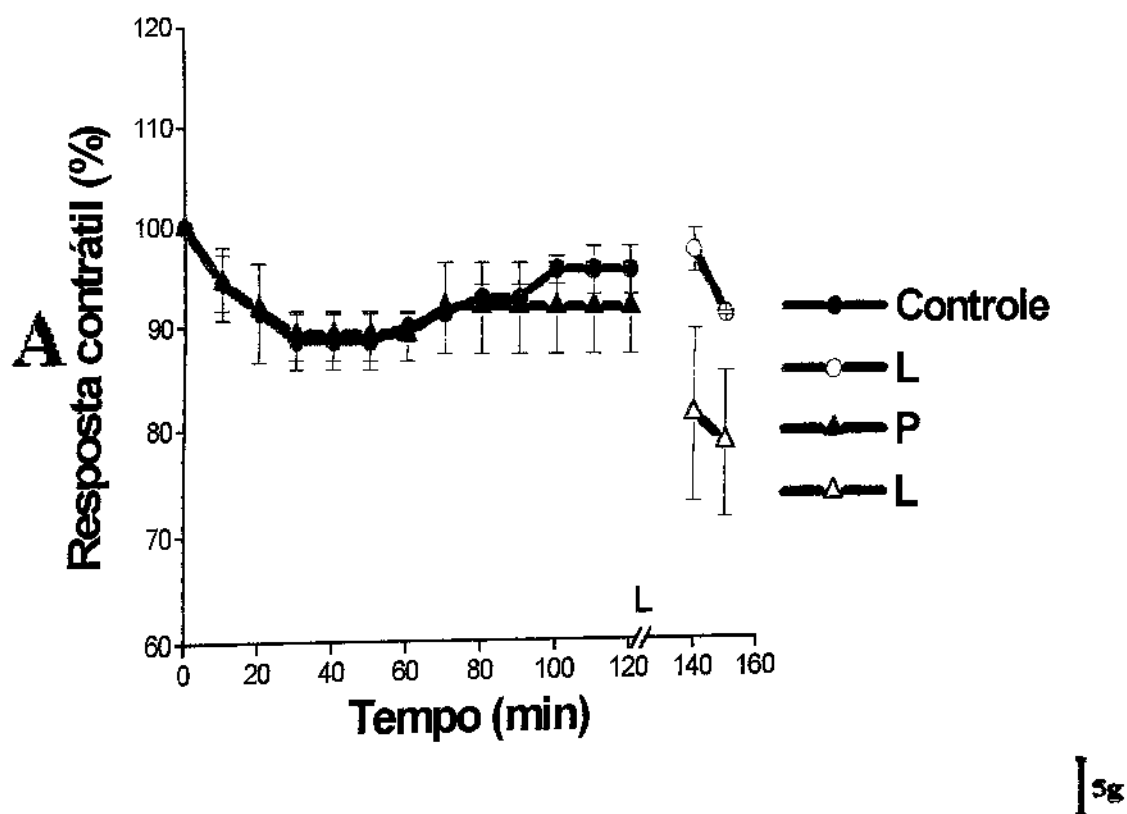


FIG. 5-Efeito da prednisolona (0,3 mM) sobre a força de contração muscular da preparação NFD. Em **A**, cada ponto corresponde a média $\pm$ erro-padrão ($n = 6$). Em **B**, registro representativo contração muscular na ausência de prednisolona. Em **C**, registro representativo da contração muscular na presença de prednisolona. P: Prednisolona; L: lavagem.

Após 3 lavagens consecutivas, houve uma leve diminuição na amplitude da resposta muscular, a qual ainda se manteve bem acima ($185 \pm 15\%$) dos valores-controle (Fig. 7 **A** e **C**).

4.1.1.6. Guanidina (G) - 2,5 mM- A incubação de preparações neuromusculares isoladas do músculo diafragma de camundongo ($n = 8$), em solução 2,5 mM de cloreto de guanidina, até 120 min determinou um aumento inicial da amplitude de contração muscular ($n=8$). Assim, o aumento máximo da amplitude de contração ficou em $73 \pm 30\%$ em relação ao controle, aos 70 min, e $40 \pm 30\%$ ao final de 120 min de incubação (Fig. 8 **A** e **B**). Em duas preparações a amplitude após 120 min, foi em média 30% maior que a amplitude controle. Após a lavagem das preparações, o registro miográfico mostrou um aumento da amplitude da resposta muscular da ordem de 220% (Fig. 8 **A**).

4.1.1.7. Prednisolona (P) - 0,3 mM + Guanidina (G) - 2,5 mM- Na presença de prednisolona ($n = 8$), o efeito facilitador primário da guanidina diminuiu ficando em torno de $30 \pm 7\%$ aos 50 min e, em seguida, ocorreu também uma progressiva tendência a bloqueio que atingiu $60 \pm 14\%$ ao final de 120 min de experimento. Em três preparações, a amplitude de resposta ficou abaixo de 40% em 120 min (Fig. 8 **A** e **C**). Após 3 lavagens ocorreu um novo aumento da resposta

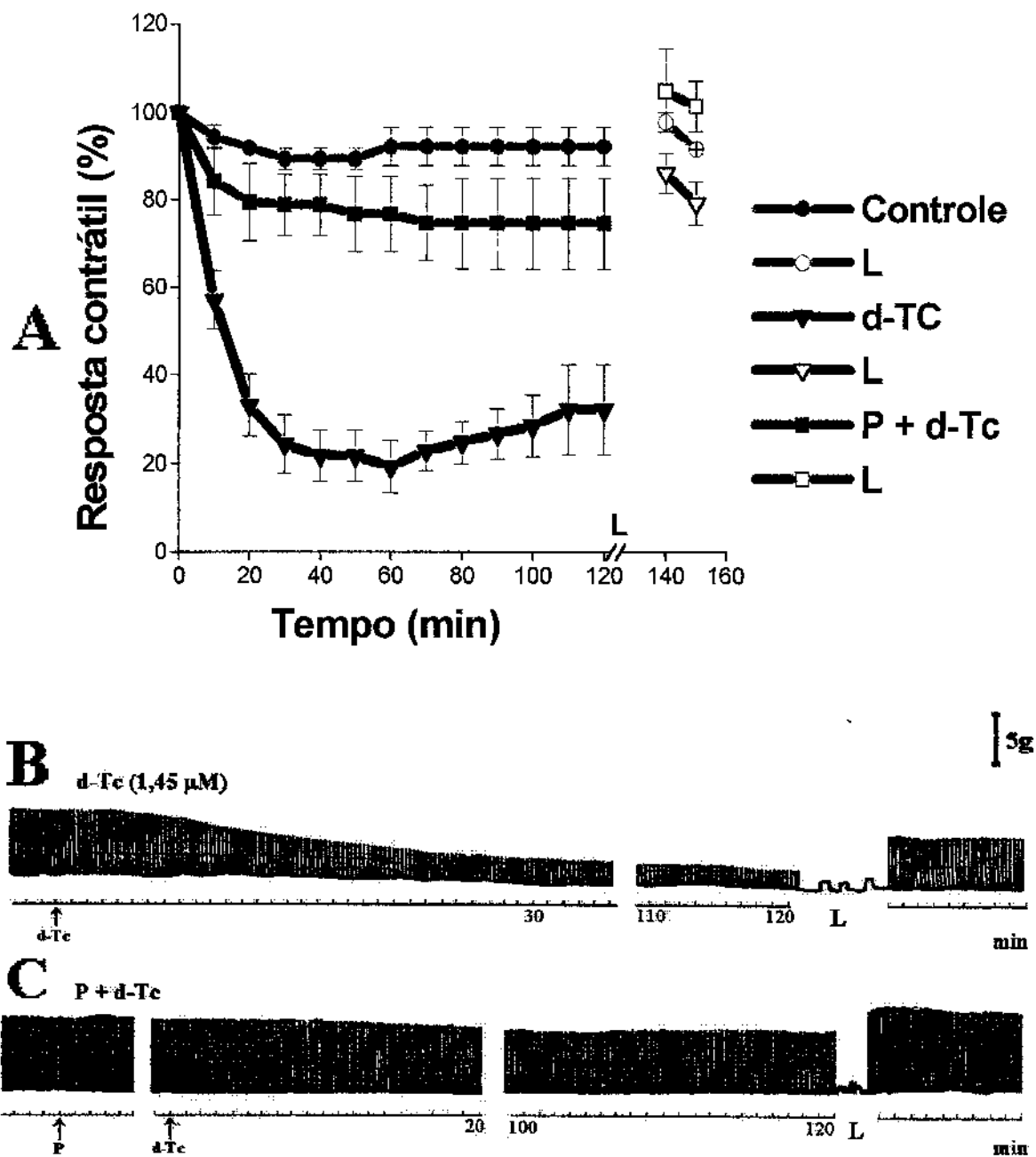


FIG. 6- Efeito protetor da prednisolona contra o bloqueio neuromuscular induzido pela d-Tc em preparação NFD- Registro miográfico. Em (A) cada ponto corresponde a média $\pm$ erro-padrão ($n = 6$). Em (B), registro representativo da resposta contrátil à d-Tc (1,45 μ M). Em (C), registro representativo da resposta contrátil à d-Tc (1,45 μ M) após pré-incubação com prednisolona (0,3 mM). P: prednisolona; L: lavagem.

contrátil, que ficou em $50 \pm 10\%$ maior que a resposta inicial, em que apenas uma preparação demonstrou aumento maior que 100%, ficando bem abaixo da amplitude de resposta contrátil na ausência de prednisolona (30% menor) (Fig. 8 **A**).

4.1.1.8. Guanidina (G) - 5 mM- A incubação de preparações NFD de camundongo com cloreto de guanidina 5 mM ($n = 3$) determinou um aumento inicial da amplitude de contração muscular de $31 \pm 9\%$ em 20 min, seguido de bloqueio parcial de $52 \pm 13\%$ ao final de 120 min de observação (Fig. 9). Em nenhum dos experimentos realizados, observou-se bloqueio total das respostas musculares. A lavagem da preparação determinou um novo aumento da resposta contrátil da ordem de $98 \pm 30\%$ maior que a resposta contrátil inicial (Fig. 9 **A e B**).

4.1.1.9. Prednisolona (P) - 0,3 mM + Guanidina (G) - 5 mM- Neste tipo de experimento também se observou uma atenuação do efeito induzido pela guanidina ($n = 7$), quando comparado com o de preparações não incubadas pela prednisolona. Este tratamento determinou um aumento máximo da amplitude da resposta muscular de $31 \pm 10\%$ que ocorreu aos 40 min, seguido de bloqueio parcial da resposta contrátil ($70 \pm 6\%$, 120 min.) (Fig. 9 **A e C**). Em 5 preparações, o bloqueio da força de contração foi total. A pós-lavagem da preparação determinou um novo aumento da amplitude de resposta contrátil.

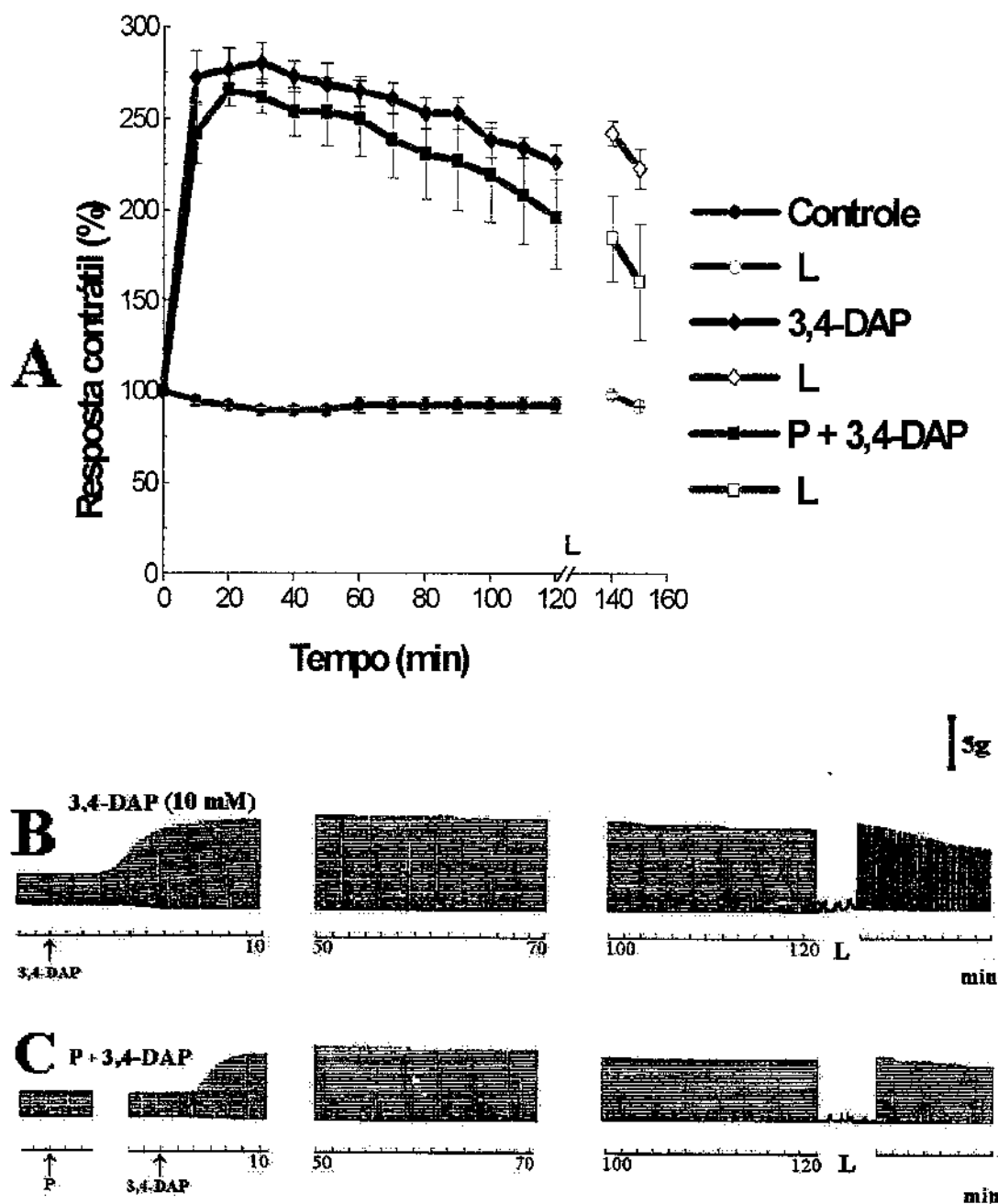


FIG. 7- Respostas musculares produzidas por 3,4-DAP (10 mM) em preparações previamente incubadas ou não pela prednisolona (0,3 mM). Não houve diferença significativa na presença ou ausência de prednisolona (0,3 mM). Em **(A)** cada ponto corresponde a média $\pm$ erro-padrão ($p > 0,05$, $n = 6$). Em **(B)** resposta contrátil da 3,4-DAP isolada. Em **(C)** preparação previamente incubada com prednisolona (0,3 mM). P: Prednisolona, 3,4-DAP: 3,4-diaminopiridina, L: lavagem.

Assim o pré-tratamento com P modificou visivelmente o padrão de resposta da guanidina (5 mM) diminuindo a facilitação inicial e intensificando o bloqueio neuromuscular.

4.1.1.10. Guanidina (G) - 10 mM- A incubação de preparações NFD de camundongo ($n = 3$) em solução de cloreto de guanidina 10 mM durante um tempo de 120 min determinou um aumento inicial da amplitude de contração ($30, \pm 11\%$) em 40 min, seguido de bloqueio neuromuscular parcial ($84 \pm 15\%$) após 120 min de observação. (Fig. 10 **B**). Em duas preparações houve bloqueio completo aos 120 min. A lavagem demonstrou um novo aumento da amplitude de resposta contrátil de $77 \pm 40\%$ maior que a resposta contrátil inicial (Fig 10 **A**).

4.1.1.11. Prednisolona (P) - 0,3 mM + Guanidina (G) - 10 mM- A prednisolona mudou o perfil de respostas em preparações incubadas com guanidina 10 mM ($n = 3$), determinando uma mudança no perfil miográfico característico da guanidina. Assim, a incubação prévia com a prednisolona determinou 50% de bloqueio em 60 min, ao invés de em 80 min (Fig 10 **A e C**). Além disso, após a lavagem da preparação, não se observa o aumento da amplitude de contração muscular típico da guanidina (Fig. 10 **A**).

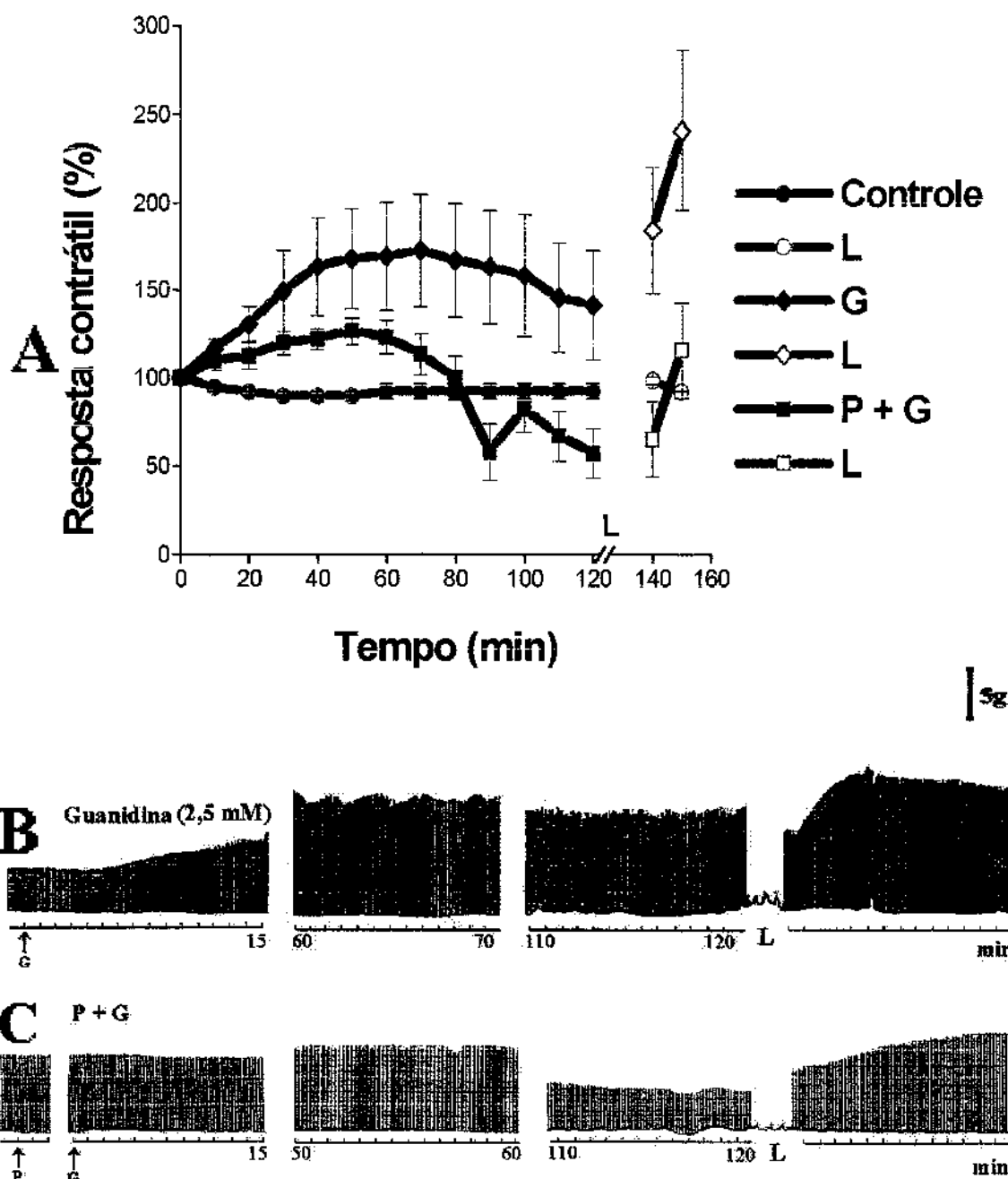


FIG. 8- Influência da prednisolona (0,3 mM) sobre a facilitação neuromuscular da guanidina (2,5 mM). Em **(A)**, cada ponto corresponde à média $\pm$ erro-padrão ($p \leq 0,05$, $n = 6$). Em **(B)** registro representativo da da resposta contrátil à guanidina (2,5 mM). Em **(C)**, registro representativo da resposta contrátil à guanidina (2,5 mM) após pré-incubação com prednisolona (0,3 mM). P: Prednisolona; G: guanidina; L: lavagem.

4.1.1.12. β -Bungarotoxina (β -BuTx) - 0,15, 0,25 e 1 μ M- Em preparações NFD de camundongo sob estimulação elétrica indireta, a adição de β -BuTx induziu um aumento da amplitude das contrações musculares ($p > 0,05$). Este aumento atingiu seu valor máximo aos vinte minutos ($5 \pm 0,6\%$) ($n = 8$) para a dose de 0,15 μ M (Fig. 11) e aos 10 min. ($5 \pm 0,3\%$; $n=3$) para a dose de 0,25 μ M ($n = 3$) (Fig. 12). Após este período, instalou-se um bloqueio progressivo da amplitude das contrações que atingiu 50% aos 100 ± 10 min (0,15 μ M) (Fig. 11 e 12). Assim, empregando-se doses crescentes (0,25 μ M), verificou-se um bloqueio de 50% também em 100 ± 10 min (Fig 12). Após sucessivas lavagens (L) das preparações, o bloqueio continuou a progredir. Na dose de (1 μ M, $n = 4$) β -BuTx determinou um bloqueio progressivo das contrações musculares que atingiu $50 \pm \%$ aos 90 min (Fig 13). Sucessivas lavagens da preparação, também foram ineficazes em reverter este bloqueio.

4.1.1.13. Prednisolona (P) + β -bungarotoxina (β -BuTx) - O pré-tratamento das preparações com prednisolona não modificou de modo significativo as respostas contráteis à β -BuTx (0,15 e 0,25 μ M) e o tempo necessário para bloqueio de 50% (Fig. 11 e 13). Porém, a pré-incubação da prednisolona e posterior adição de β -bungarotoxina (1 μ M) ao banho da preparação submetida à estimulação elétrica indireta induziu aumento na amplitude das respostas contráteis.

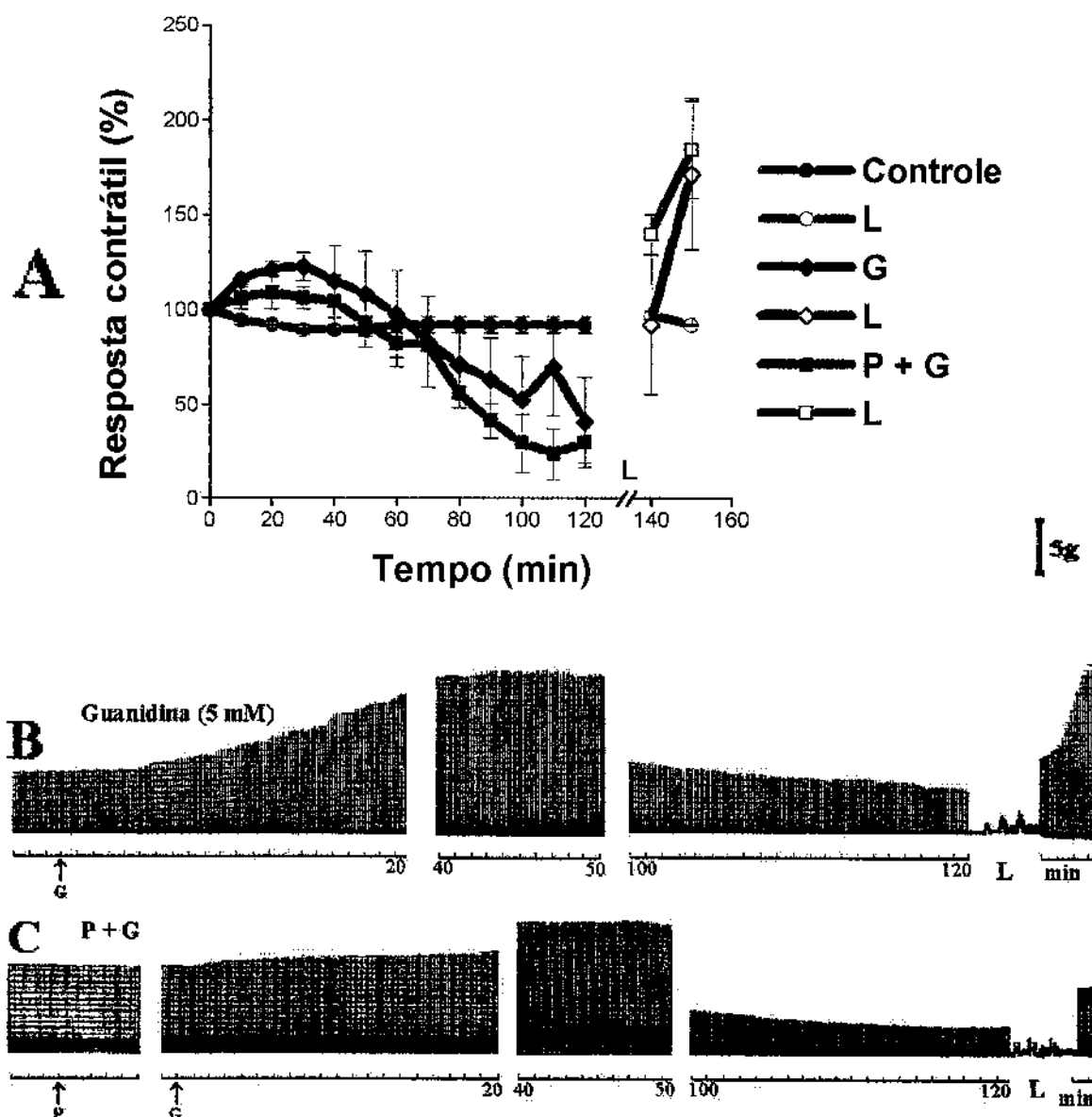


FIG. 9. Contrações musculares em preparações NFD tratadas com guanidina (5 mM) na ausência e presença de prednisolona (0,3 mM). Note a atenuação da resposta à guanidina (5 mM) quando a preparação é pré-incubada com a prednisolona (0,3 mM). Em (A) cada ponto corresponde à média $\pm$ erro padrão ($p > 0,05$, $n=3$). Em (B), registro representativo da resposta contrátil à guanidina (5 mM). Em (C), registro representativo da resposta contrátil à guanidina (5 mM) após pré-incubação com prednisolona (0,3 mM). P: prednisolona; G: guanidina; L: lavagem.

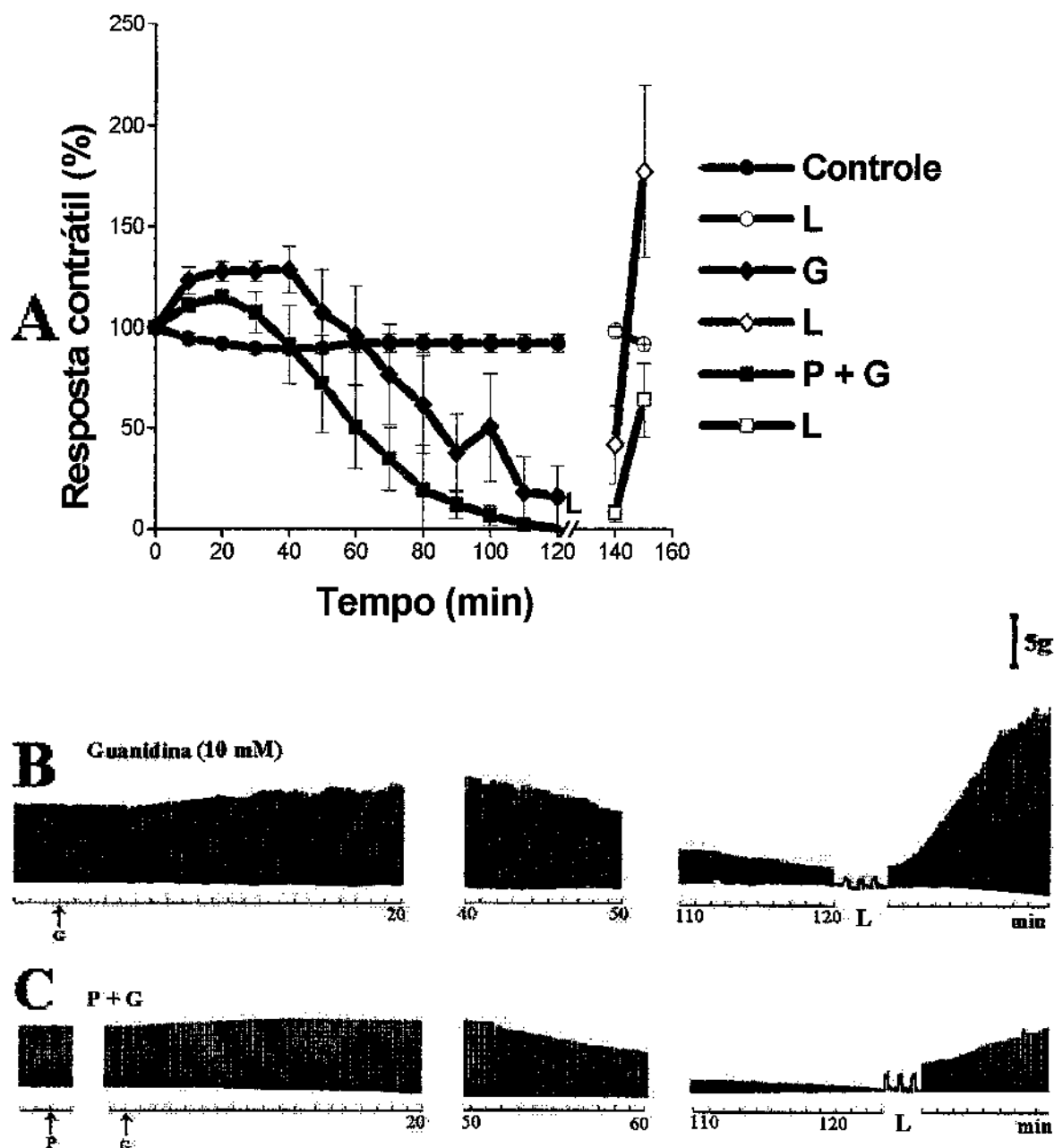


FIG. 10- Bloqueio neuromuscular induzido pela guanidina (10 mM) em preparação NFD pré-tratada com prednisolona (0,3 mM). Em (A) cada ponto corresponde a média $\pm$ erro-padrão ($p \leq 0,05$, $n = 3$). Em (B), registro representativo da resposta contrátil à guanidina (10 mM). Em (C) registro representativo da resposta contrátil à guanidina (10 mM) após pré-incubação com prednisolona (0,3 mM). P: prednisolona; G: guanidina; L: lavagem.

Este aumento foi de $(13 \pm 4\%)$ aos 20 min. Após esta fase, instalou-se um bloqueio progressivo das contrações musculares que atingiu $50 \pm 10 \%$ aos 90 min. Repetidas lavagens das preparações (L) não reverteram o bloqueio (Fig. 13).

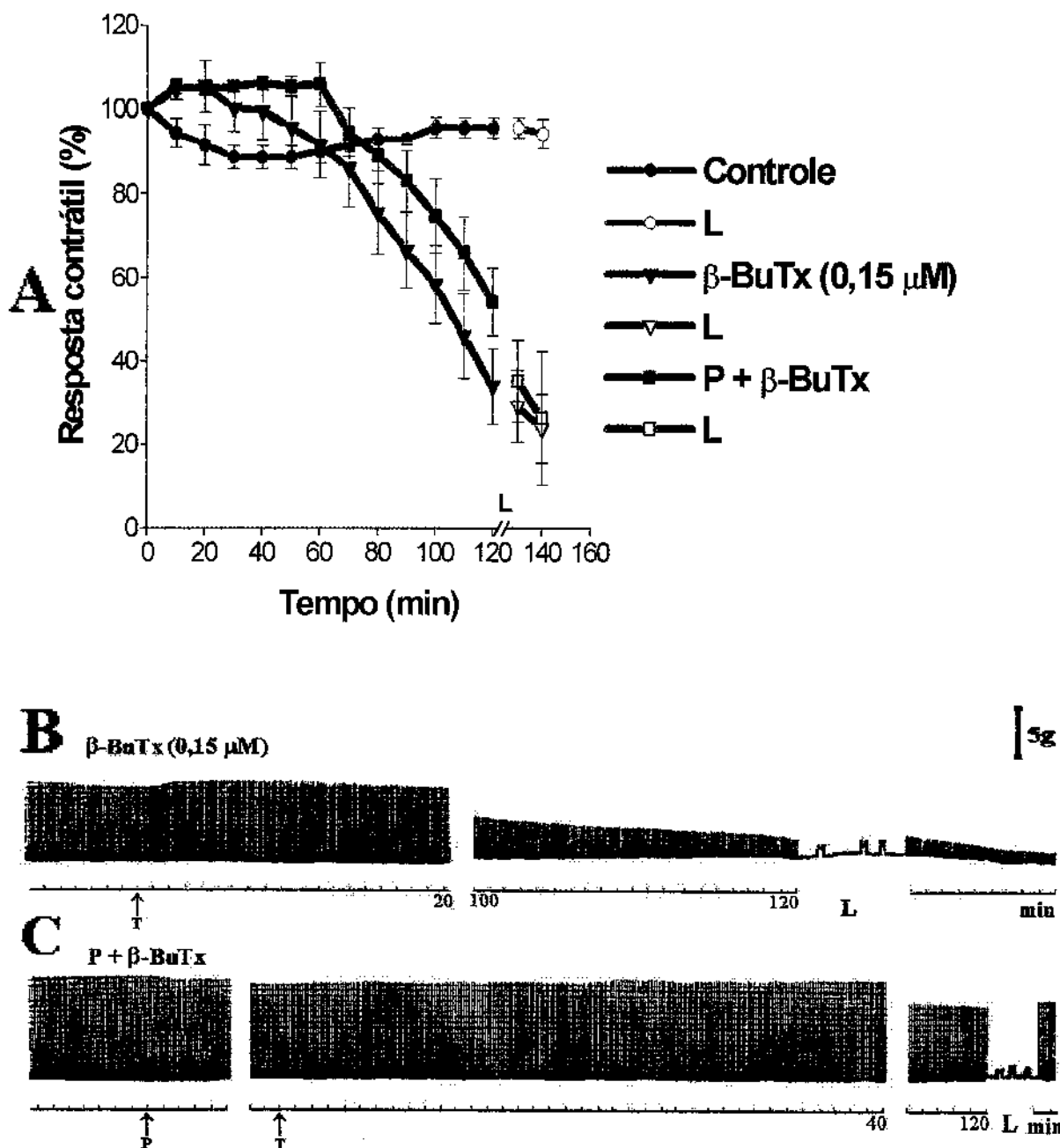


FIG. 11- Respostas contráteis à β -BuTx em preparação NFD pré-incubada ou não com prednisolona. Em **A**, cada ponto corresponde a média $\pm$ erro-padrão ($p > 0,05$, $n = 8$). Em **B**, registro representativo da resposta contrátil à β -BuTx (0,15 μ M). Em **C**, registro representativo da resposta contrátil à β -BuTx (0,15 μ M) após pré-incubação com prednisolona (0,3 mM). P: prednisolona; T: toxina; L: lavagem.

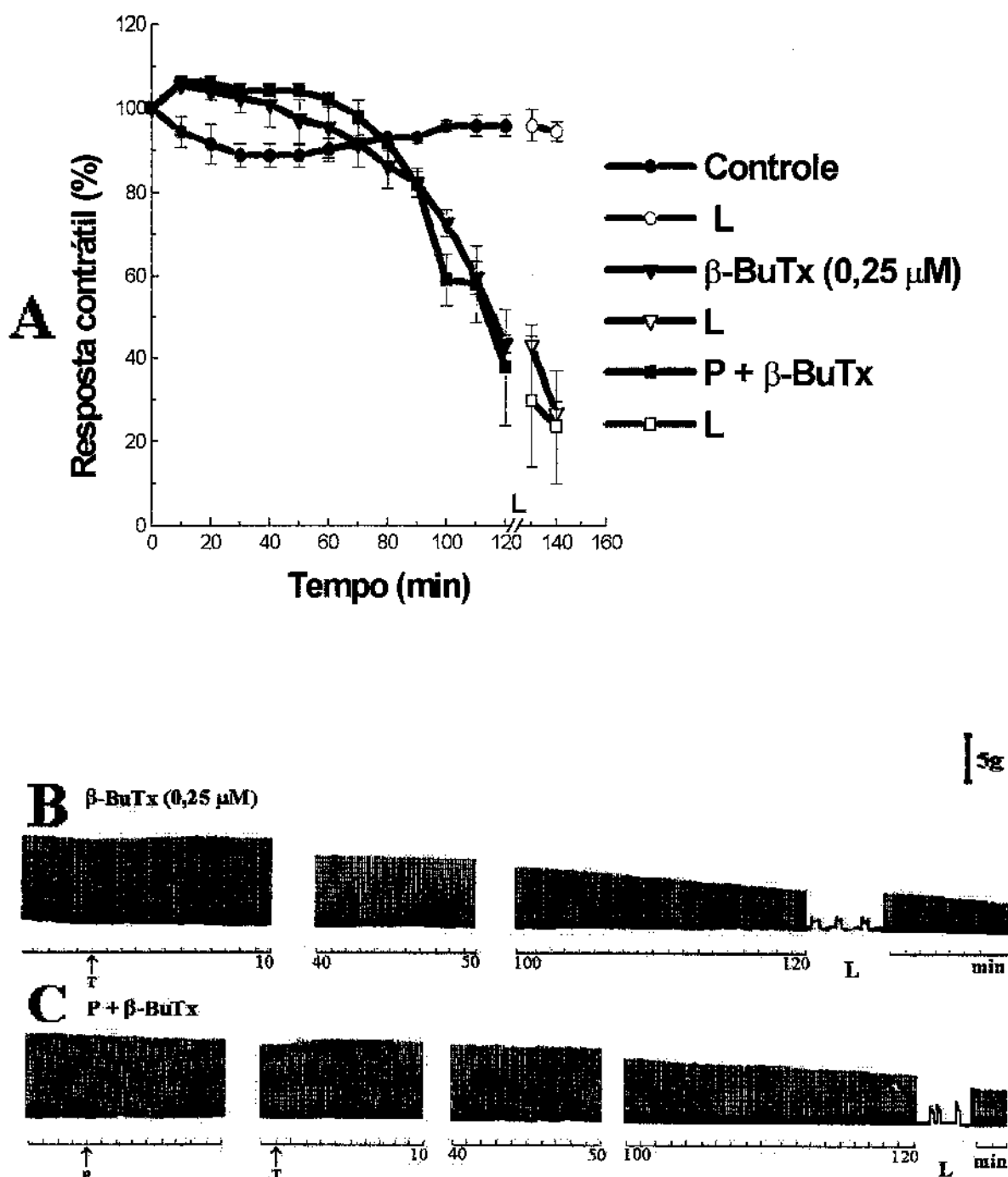


FIG. 12- Respostas à β -BuTx em preparação NFD pré-incubadas ou não com prednisolona. Em **A**, cada ponto representa a média $\pm$ erro-padrão de 3 experimentos. Em **B**, registro representativo da resposta contrátil à β -BuTx (0,25 μ M). Em **C**, registro representativo da resposta contrátil à β -BuTx (0,25 μ M) após pré-incubação com prednisolona (0,3 mM). P: prednisolona T: toxina; L: lavagem.

4.1.2. PREPARAÇÃO NERVO CIÁTICO-POPLÍTEO EXTERNO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR (NPE)

Nesta preparação, a injeção, por via i.p de d-Tc (225 $\mu\text{g/kg}$), determinou um bloqueio neuromuscular máximo de $50 \pm 17\%$ aos vinte minutos, o qual foi mantido até o final de 60 min do experimento, quando a força de contração muscular ficou em $10,7 \pm 9\%$ do controle (Fig 14).

Na dose de 400 $\mu\text{g/kg}$ i.p., dada 15 min antes da adição de d-Tc, antagonizou quase que completamente o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina ($p \leq 0,01$) (Fig 14 **A**). Sozinha, a prednisolona não alterou a amplitude de contração muscular em 60 min (Fig 14).

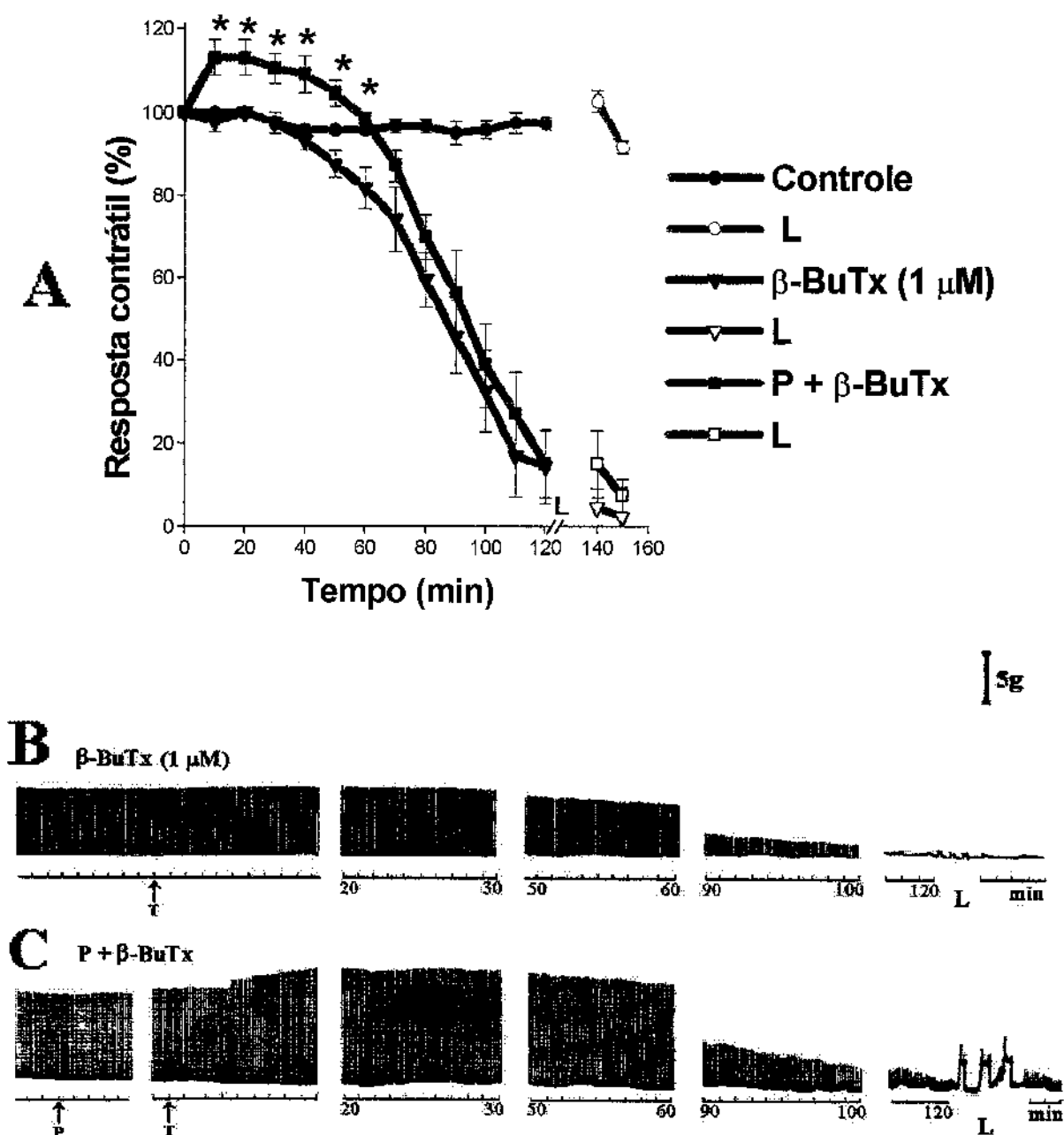


FIG. 13- Registro da força de contração muscular em preparação NFD estimulada indiretamente e tratada com β -BuTx (1 μ M). Em **A**, cada ponto representa a média $\pm$ erro-padrão de 3 experimentos. Em **B**, registro representativo da resposta contrátil à β -BuTX (1 μ M). Em **C**, registro representativo da resposta contrátil à β -BuTX (1 μ M) após pré-incubação com prednisolona (0,3 mM). P :prednisolona; T: toxina; L :lavagem; * significância.

4.2. POTENCIAIS BIOELÉTRICOS

4.2.1. POTENCIAL DE REPOUSO (PR)

A medida do potencial de membrana foi feita aos 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a adição de prednisolona (0,03 e 0,3 mM), β -BuTx (1 μ M) e prednisolona (0,3 mM) mais β -BuTx. Antes da adição, estabeleceu-se um controle.

Nas concentrações usadas a prednisolona não afetou o potencial de membrana das fibras musculares do diafragma. Resultado igual foi obtido na placa motora e na fibra muscular em regiões distantes dela. De modo semelhante à prednisolona, a β -BuTx não alterou o potencial de repouso da membrana e suas respostas não foram afetadas pelo esteróide (Fig. 15).

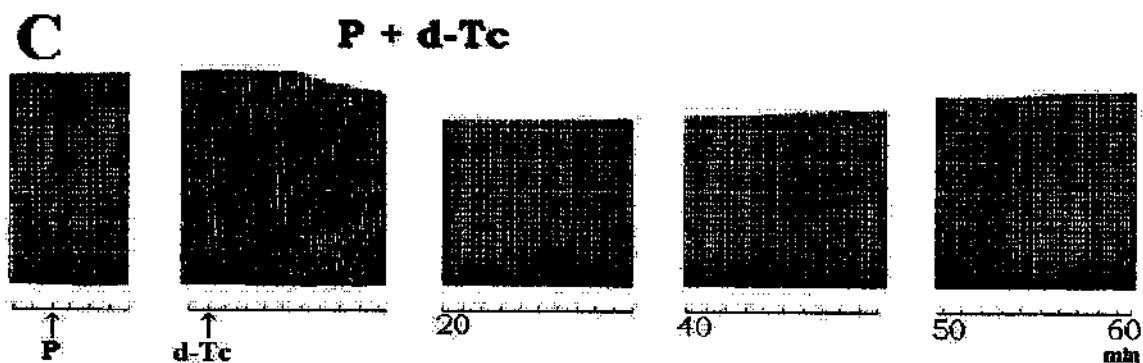
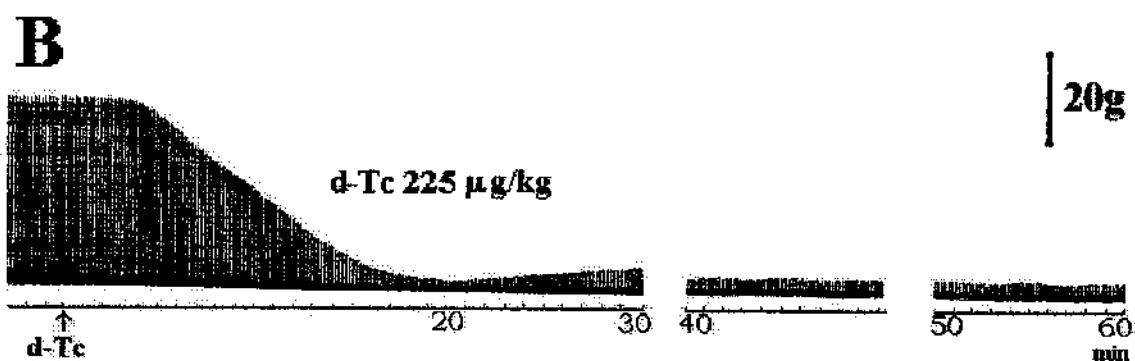
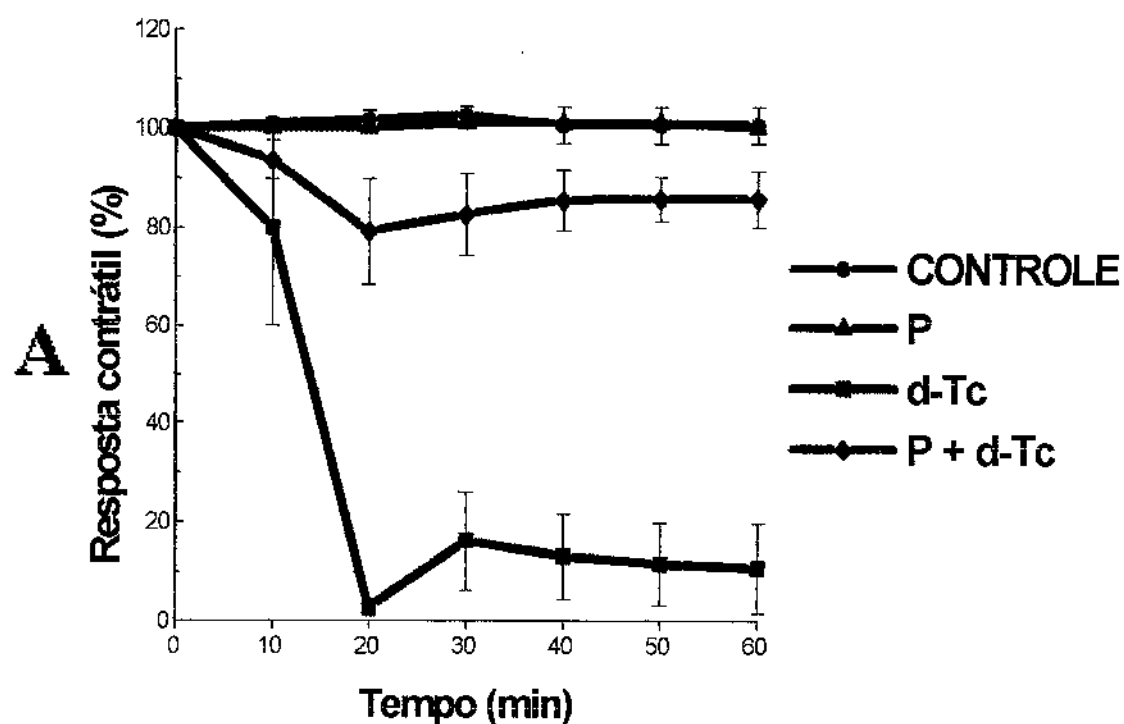


FIG. 14- Efeito da prednisolona (400 µg/kg) sobre o bloqueio neuromuscular produzido pela d-Tc (225 µg/kg) em preparação NPE. **A**, representa a média $\pm$ erro-padrão de 5 experimentos ($p \leq 0,01$). **B** e **C** são registros representativos dos experimentos em A. P: prednisolona.

4.2.2. POTENCIAL DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA (PPTM)

Os resultados a seguir correspondem aos registros intracelulares de 12 experimentos, utilizando-se prednisolona nas doses de 0,03 e 0,3 mM. Não houve diferença significativa entre as respostas às duas doses (Tab. 1).

A ação da prednisolona sobre os pptm caracterizou-se, em geral, por um aumento na frequência e amplitude destes potenciais durante os primeiros minutos de incubação seguido por uma leve diminuição na amplitude destes potenciais, mas que ainda se manteve acima dos níveis de controle (Fig. 16 e 17). Semelhante, a diminuição na frequência dos pptm após os primeiros 20 min foi em paralelo o aumento na amplitude dos pptm (pptm gigantes).

A presença de β -BuTx (1 μ M) promoveu um aumento ($56 \pm 2\%$) progressivo da frequência e amplitude dos pptm já nos primeiros 5 min de registro ($n = 4$). Este efeito evoluiu para um aumento (108%, 30 min) seguido de uma diminuição gradativa da amplitude e frequência destes potenciais até se instalar o bloqueio (Fig. 18).

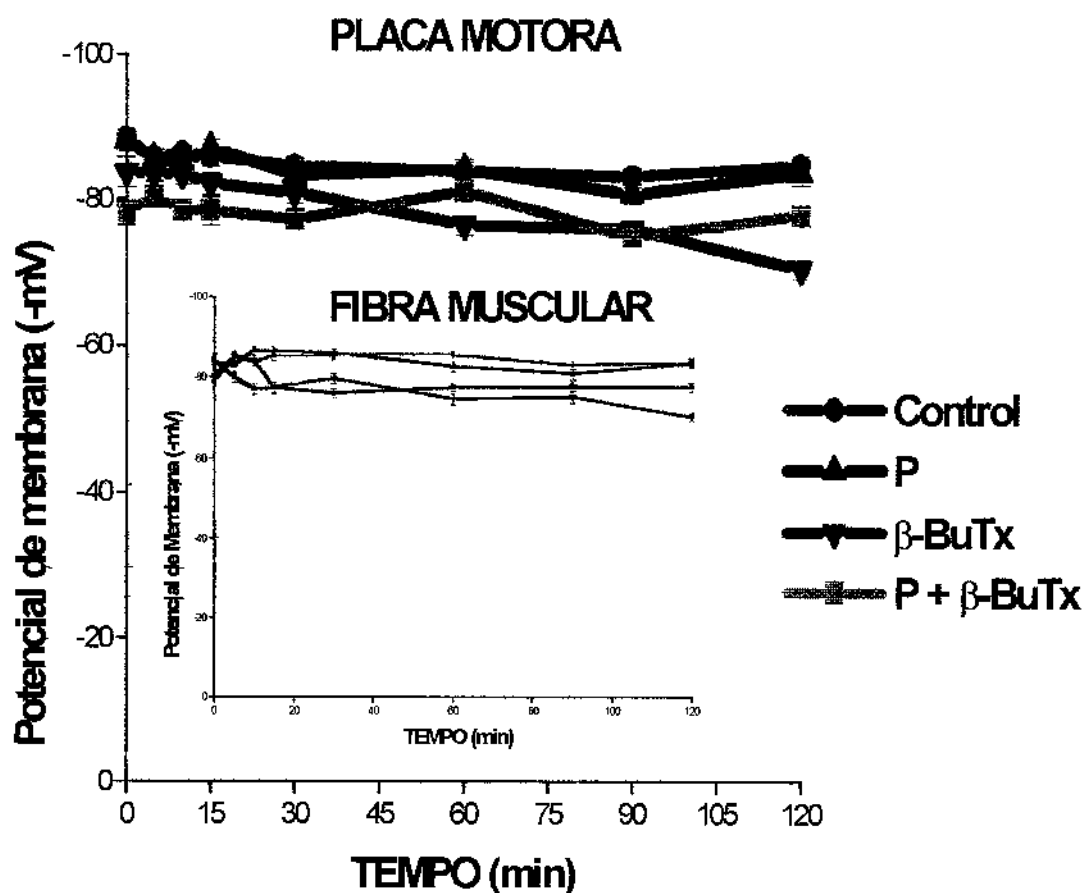


Fig. 15- Efeito da prednisolona (0,03 mM) sobre o potencial de repouso da placa motora e fibra muscular em preparação NFD. Note que a adição de β -BuTx 1 μ M ($p > 0,05$; $n=3$), não alterou significativamente o padrão de resposta da prednisolona, tanto na placa motora quanto na fibra muscular. P: prednisolona.

A adição de prednisolona 0,3 mM ao banho na presença de β - BuTx não alterou significativamente o padrão de resposta da toxina ($n=3$) (Fig. 19). No entanto, nos primeiros 5 min de incubação ($p \leq 0,05$), o aumento da frequência nas preparações tratadas com prednisolona foi 16% maior do que nas preparações tratadas somente com β -Butx (Tab.1).

Tabela 1- Frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura em diferentes tempos e tratamentos.

Tratamento	Frequência dos pptm			
	Controle	5 min	30 min	60 min
Prednisolona (0,03 mM)	36 ± 9	77 ± 6	66 ± 13	55 ± 8
Prednisolona (0,3 mM)	46 ± 2	124 ± 4	$104 \pm 0,6$	92 ± 38
β -BuTx (1 μ M)	41 ± 3	56 ± 2	108 ± 10	90 ± 9
P (0,3 mM) + β -BuTx (1 μ M)	43 ± 5	69 ± 15	87 ± 11	77 ± 9

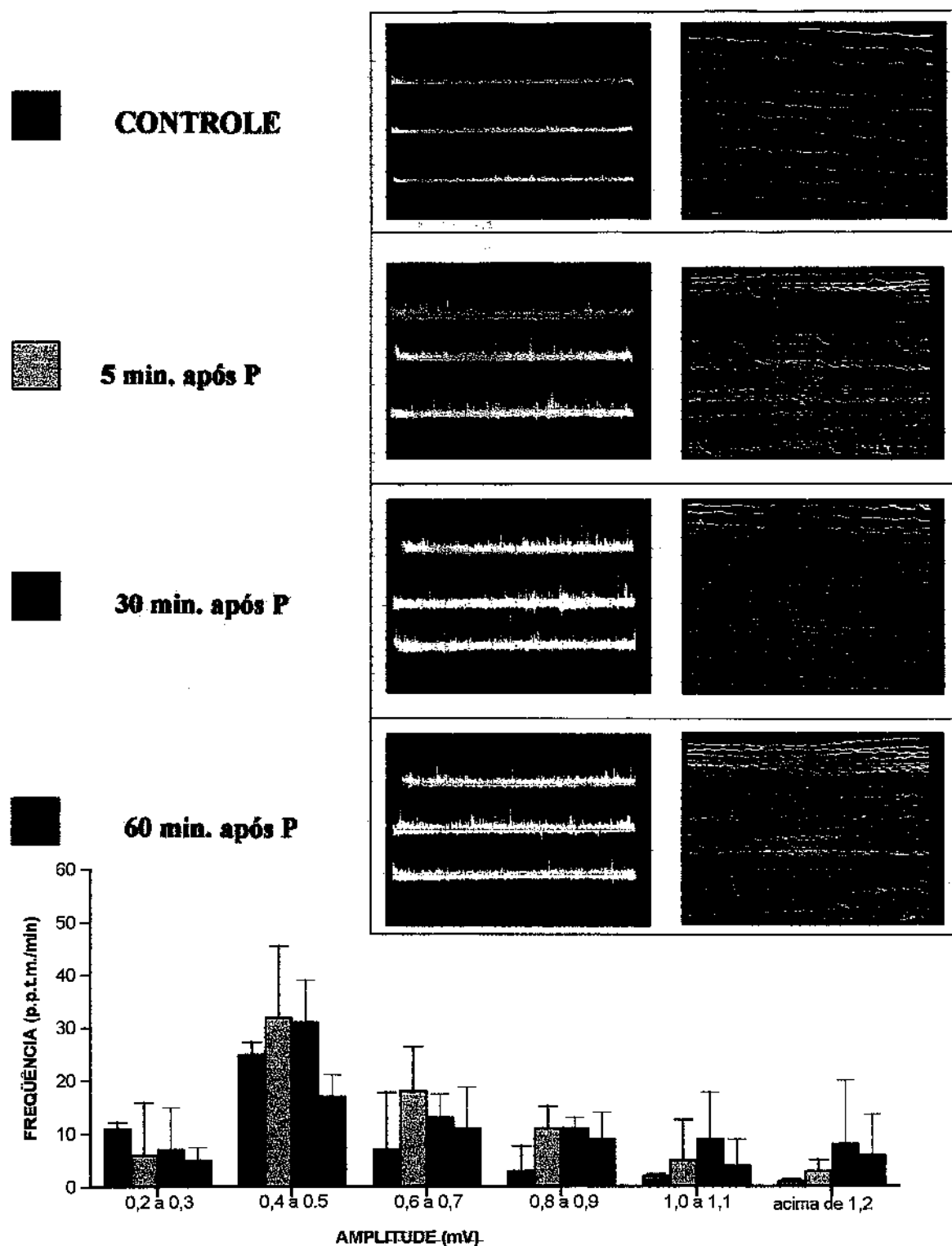


Fig. 16- Ação da prednisolona (0,03 mM) sobre a amplitude e frequência dos p.p.t.m. O gráfico mostra a média + erro padrão de 3 experimentos. Observe o aumento dos p.p.t.m. nos primeiros minutos de incubação, seguido de uma leve diminuição da frequência e amplitude. P: prednisolona.

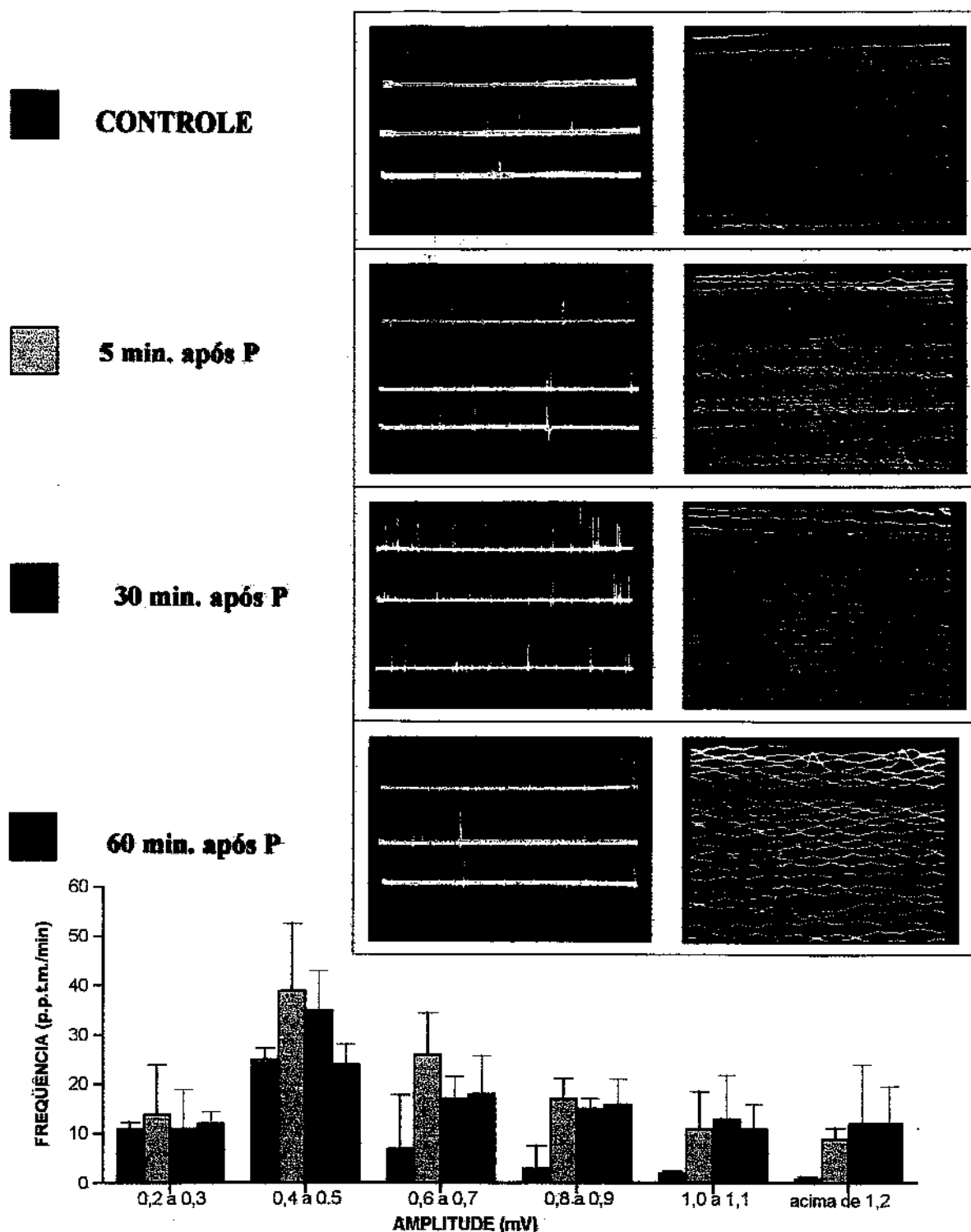


Fig. 17- Efeitos induzidos pela prednisolona (0,3 mM) sobre a frequência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura. Observe o aumento da frequência e amplitude dos pptm nos primeiros minutos, seguido de diminuição da frequência e o aparecimento de pptm gigantes. P: Prednisolona.

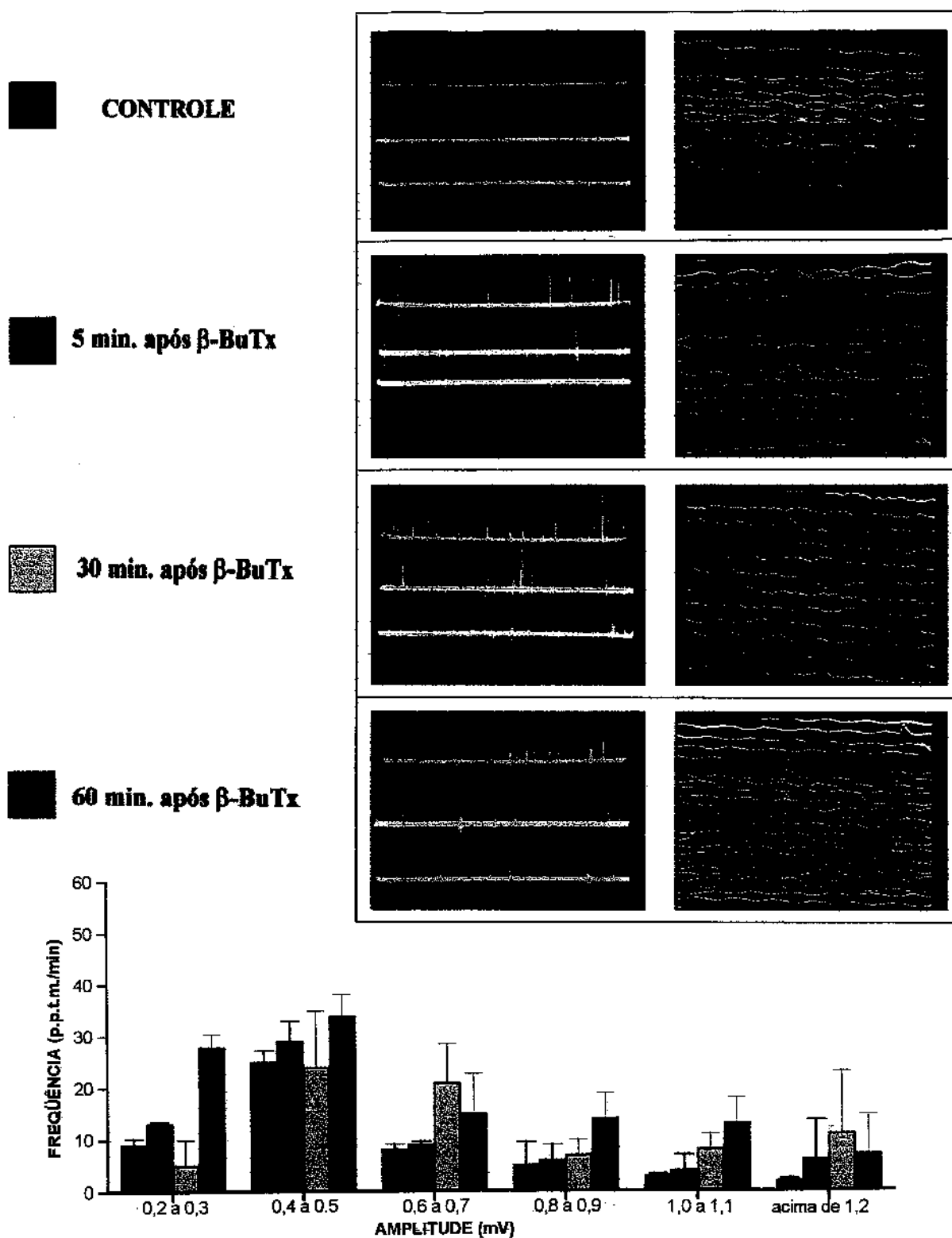


Fig. 18-Efeito induzido pela β -BuTx ($1 \mu\text{M}$) sobre os p.p.t.m.

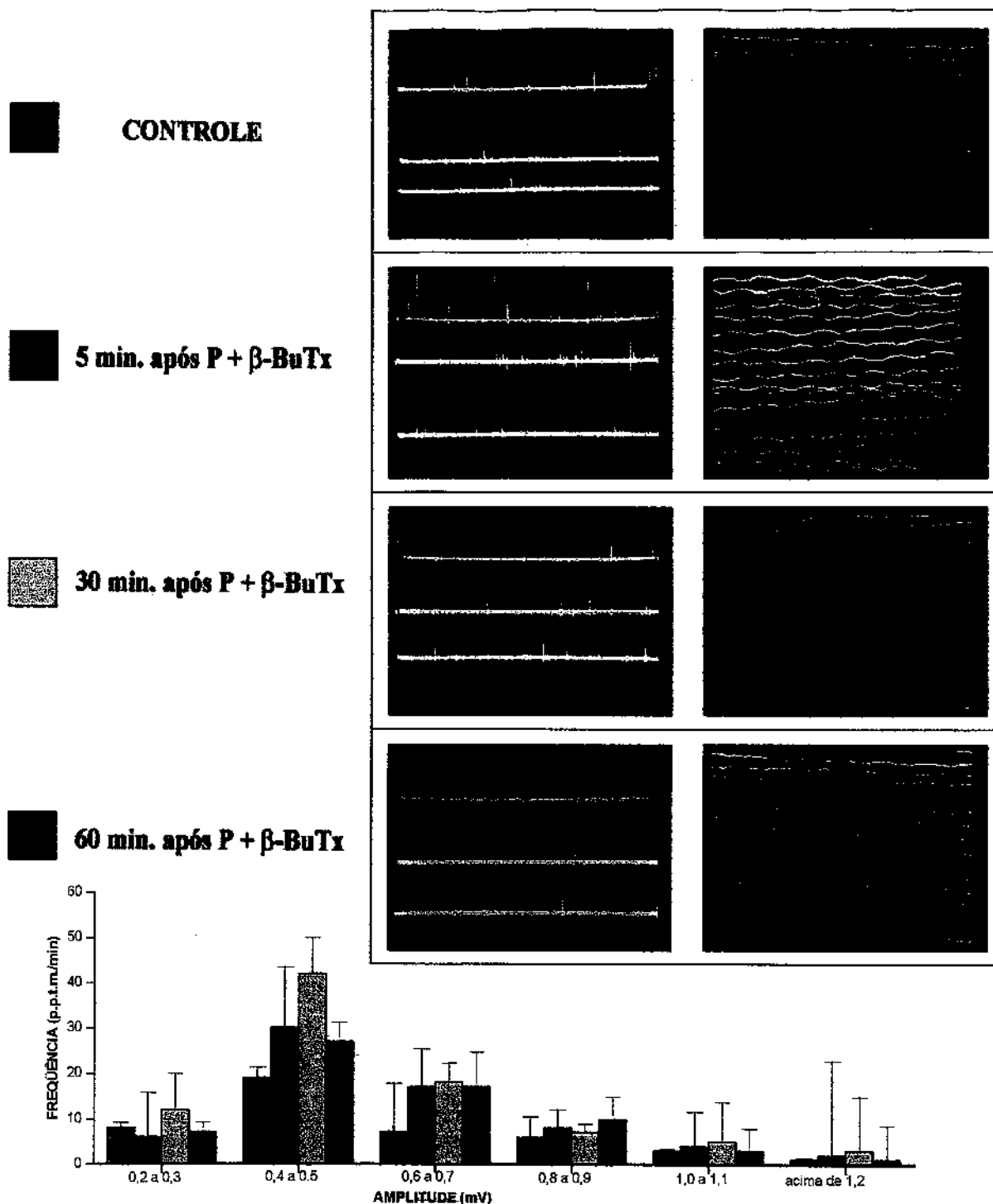


Fig. 19- Ação da prednisolona (0,3 mM) + β -BuTx (1 μ M) sobre a frequência e amplitude dos p.p.t.m. Observe o aumento da frequência já nos primeiros 5 min iniciais em relação ao controle com β -BuTx isolada. P: prednisolona.

5. DISCUSSÃO

Confirmando dados da literatura (WOLTERS *et al.*, 1974 e LEEUWIN *et al.*, 1981), a incubação com prednisolona (0,03 – 0,3 mM) de preparações NFD de camundongo (Fig. 4 e 5), não alterou o padrão de resposta contrátil destas preparações neuromusculares. Entretanto, quando previamente aplicada nas maiores concentrações (0,3 mM), verificamos que a prednisolona, mostrou-se capaz de prevenir o bloqueio neuromuscular induzido por concentrações eficazes de d-Tc (Fig. 6) corroborando com os resultados de LEEUWIN & VELDESEMA-CURRIE (1979) e LEEUWIN *et al.* (1981) que utilizaram diafragmas isolados de ratos. Estes últimos autores evidenciaram, outrossim, a capacidade da prednisolona de reduzir a amplitude da inibição de Wedensky, desencadeada pela d-Tubocurarina, na vigência da aplicação de estímulos tetanizantes. Este resultado afigura-se coerente em termos de uma possível ação pré-sináptica da prednisolona. Com efeito, esta hipótese foi consubstanciada pelo aumento da amplitude e, principalmente, da frequência dos pptms, induzido pelo corticóide em nossas preparações de camundongo (Fig. 16 e 17), que confirmam resultados análogos obtidos por WILSON *et al.* (1974), ENGEL (1976), KIM *et al.* (1979), VAN WILGENBURG *et al.* (1982), DALKARA & ONUR (1987) porém em diafragmas isolados de rato, bem como reforçada pela capacidade desse e

outros corticóides (hidrocortisona e dexametasona) de reduzirem o efeito bloqueador neuromuscular induzido pelo hemicolinio em preparações de rato submetidas a estímulos de média e elevadas frequências (WOLTERS *et al.*, 1974; WOLTERS & LEEUWIN, 1975; WOLTERS & LEEUWIN, 1976).

Face a esses dados, altamente sugestivos de uma possível ação pré-sináptica desses hormônios, acrescidos da capacidade destes últimos de aumentar a taxa de recaptação de colina marcada (VELDESEMA-CURRIE *et al.*, 1976), LEEUWIN & VELDESEMA-CURRIE (1979) aventaram a hipótese desses esteróides interferirem diretamente no processo ativo de transporte transmembrânico da colina para dentro do terminal nervoso motor. A este propósito, segundo VELDESEMA-CURRIE *et al.* (1984), os corticóides funcionariam como agentes cooperadores positivos desse sistema que levaria a um aumento dos estoques intracelulares de acetilcolina. Este fato explicaria, segundo VAN WILGENBURG (1979), o aumento da frequência dos pptms bem como o aparecimento dos pptms gigantes em diafragmas isolados de rato, fenômeno por nós confirmado em diafragmas isolados de camundongo (Fig. 16 e 17), que resultariam do aumento do número de unidades de acetilcolina por vesícula de forma a constituir pacotes pluriquantais do mediador.

Baseado nisso, poderíamos considerar a prednisolona, bem como os demais glicocorticóides assinalados, como verdadeiros agentes facilitadores da transmissão a nível da junção neuromuscular, com eventuais implicações clínicas envolvendo o tratamento das distrofia musculares.

Em termos de facilitação da neurotransmissão a nível da musculatura esquelética, RIKER & STANDAERT (1966) definem como substância facilitadora, aquela que: (1) potencia a resposta contrátil do músculo esquelético quando submetido a estímulos maximais, indiretos e isolados; (2) antagoniza o curare e (3) é anti-miastênica. Os anticolinesterásicos, tais como, a neostigmina, a fisostigmina e o edrofônio, possuem integralmente essas propriedades. Já os glicocorticóides poderiam ser considerados pertencentes a um novo grupo de agentes facilitadores da junção neuromuscular.

Contudo, a prednisolona praticamente não alterou o efeito neuromuscular induzido pela 3,4-DAP (Fig. 7), conhecido bloqueador de canais de K^+ voltagem-dependentes (YEH *et al.*, 1976) que aumenta a amplitude do potencial de placa terminal, através do aumento da quantidade de liberação do neurotransmissor para cada impulso nervoso (LUND, 1979; MOLGO *et al.*, 1980; HONG & CHANG, 1990). Isto poderia ser explicado não só em virtude do emprego de elevadas doses de 3,4-DAP que causam respostas máximas como também pelo efêmero efeito induzido pela prednisolona que provavelmente foi mascarado pela acentuada resposta promovida pela 3,4-DAP.

Considerações análogas poderiam explicar a capacidade da prednisolona de induzir alterações no efeito facilitatório inicial da resposta trifásica induzida pela guanidina, a qual igualmente à 3,4-DAP também, oclui canais de K^+ voltagem dependente (ANDERSON & HARVEY,

1988). Porém, tem-se sugerido que este efeito trifásico estaria envolvendo também canais de Na^+ bem como o aumento do influxo de Ca^+ que seria responsável pelo bloqueio induzido pela guanidina em preparações neuromusculares (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1997). Segundo MATTHEWS & WICKELGREN (1977) a guanidina aumenta a frequência dos ppts devido ao aumento da liberação de acetilcolina (BOSCH, MORALES, BADIA, BAÑOS, 1992). Este fenômeno poderia explicar o reforço do bloqueio neuromuscular secundário na vigência do emprego da prednisolona já que, em nossas condições experimentais, a prednisolona também promoveu o aumento dos ppts, o que, somado aos conhecidos efeitos pré-sinápticos induzidos pela guanidina, (CRUZ-HÖFLING & RODRIGUES-SIMIONI, 1998) poderiam sugerir que a facilitação do bloqueio característico da segunda fase de ação da guanidina, seria promovida por um excesso de neurotransmissor. Já, a diminuição do efeito facilitador secundário característico da guanidina poderia sugerir que a prednisolona estivesse atuando como a tetrodotoxina ou a saxitoxina, conhecidos bloqueadores específicos da transmissão neuromuscular que agem ligando-se aos canais de sódio e que também promovem redução do efeito facilitatório secundário induzido pela guanidina. Porém, acreditamos que as nossas condições experimentais não se revelaram adequadas para evidenciar um eventual sinergismo entre estes compostos e a prednisolona. Tal fenômeno, entretanto, tornou-se evidente na associação deste glicocorticóide com a β -bungarotoxina (Fig. 13), conhecido agente

liberador de acetilcolina em sinapses neuromusculares (CHANG & LEE, 1963; CHEN & LEE, 1970, ROWAN & HARVEY, 1988). A capacidade desses hormônios de aumentar a taxa de recaptação de colina e a incorporação da mesma em acetilcolina (VELDESEMA-CURRIE *et al.*, 1984) somada ao fato de que em diafragmas de ratos tratados com prednisolona observou-se um aumento do tamanho médio das vesículas sinápticas (VAN WILGENBURG *et al.*, 1982) e que esses hormônios antagonizam o efeito bloqueador do hemicolinio-3 (WOLTERS *et al.*, 1974) vêm reforçar a idéia de que o aumento da força de contração muscular evidenciado por nós, é provavelmente devido a um aumento na liberação do transmissor, reafirmando a hipótese inicial de um efeito pré-sináptico direto induzido pela prednisolona.

Consideramos importante a evidenciação deste sinergismo, pois o mesmo sugere a probabilidade da prednisolona facilitar a neurotransmissão em condições fisiológicas, fenômeno que associado aos seus conhecidos efeitos supressores das reações auto-imune, poderia contribuir no seu emprego terapêutico em doenças do aparelho locomotor.

6. CONCLUSÕES

Os efeitos induzidos por glicocorticóides sobre a fisiologia da transmissão neuromuscular vêm sendo objeto de numerosas pesquisas nos últimos anos, tendo como base o efeito benéfico, produzido por esses hormônios no tratamento da miastenia grave, ter sido relatado por WARMOLTS *et al.* em 1970.

Nesse sentido testamos um desses hormônios, a prednisolona, em preparações neuromusculares *in vitro* em camundongos e *in vivo* em ratos, submetidas a estímulos supramaximais de 0,1 Hz e 0,2 ms de duração.

Com base nos nossos resultados e nas considerações tecidas a respeito, chegamos as seguintes conclusões:

- ⇒ A prednisolona não alterou o perfil miográfico das preparações *in vitro* e *in vivo*, porém preveniu o bloqueio neuromuscular induzido pela d-Tc, confirmando dados da literatura que sugerem uma atividade direta do hormônio sobre a junção neuromuscular, facilitando a neurotransmissão, aspecto este que deveria ser levado em conta na vigência do emprego de bloqueadores neuromusculares em indivíduos sob tratamento crônico com glicocorticóides.
- ⇒ A prednisolona aumenta a amplitude das contrações musculares a estímulos isolados, quando associada a β -BuTx, reforçando a hipótese de facilitação da junção neuromuscular e sugerindo um local de ação a nível pré-sináptico.

- ⇒ A prednisolona aumenta a amplitude e principalmente a frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura confirmando dados da literatura e praticamente estabelecendo o nível pré-sináptico como seu principal locus de ação.
- ⇒ As considerações supra referidas, associadas à capacidade da prednisolona de facilitar a recaptação de colina, sugerem que os glicocorticóides aumentam o conteúdo quantal do terminal nervoso motor, fato que poderia explicar a facilitação neuromuscular.

7. SUMMARY

The neuromuscular effects of glucocorticoids have been studied extensively since the clinical benefits of these hormones in the myasthenia gravis were reported by WARMOLTs *et al.* in 1970.

In this work we examined neuromuscular effects of the synthetic glucocorticoid prednisolone in isolated mammalian preparations *in vitro* and *in vivo* with supramaximal stimuli of the 0,1 Hz and 0,2 ms duration.

Prednisolone (0.3 mM) antagonized the blockade produced by d-tubocurarine *in vitro* and *in vivo*. At this same concentration prednisolone increased in the muscle twitch tension responses to β -BuTx 1 μ M in isolated phrenic nerve-diaphragm preparations but did not alter the contractile responses to 3,4-diaminopyridine; prednisolone also diminished the neuromuscular effects induced by guanidine. In addition, prednisolone acted presynaptically to increase the amplitude and frequency of m.e.p.ps and generated a considerable number of giant m.e.p.ps without altering the resting membrane. These results suggest that a direct action of prednisolone on the neuromuscular transmission may increase the release of acetylcholine from the nerve terminal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, A. J. & HARVEY, A. L. - Effects of the facilitatory compounds catechol, guanidine, noradrenaline and phencyclidine on presynaptic currents of mouse motor nerve terminals. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** **388**: 133-137, 1988.
- ANDREW, J. R. & CLAMANN, H. P. - Effects of glucocorticoids on motor units in cat hindlimb muscles. **Muscle Nerve** **11**: 703-713, 1988.
- ARTS, W. F. & OOSTERHUIS, H. J. - Effect of prednisolone on neuromuscular blocking in mice *in vivo*. **Neurology** **25**: 1088-1090, 1975.
- BAKER, T.; DRAKONTIDES, A. B.; RIKER, W. F. JR. - Prevention of organophosphorus neuropathy by glucocorticoids. **Exp. Neurol.** **78**: 397-408, 1982.
- BAKER, T.; RIKER, W. F.; HALL, E. D. - Effects of a single methylprednisolone dose on a facilitatory response of mammalian motor nerve. **Arch. Neurol.** **34**: 349-355, 1977.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

- BOSCH, F.; MORALES, M.; BADIA, A.; BAÑOS, J. E. - Influence of extracellular calcium on the actions of guanidine at the rat neuromuscular junction. **Arch. Int. Pharmacodyn.** **315**: 110-119, 1992.
- BOUYARD, P.; BALANSARD, P.; EMELINA, G.; JADO, G. - Corticoïdes anti-inflammatoires et curarisation. **Comp. Rend. Soc. Biol.** **164**: 2595-2598, 1970.
- BRAUN, S.; ASKANAS, V.; ENGEL, W. K.; IBRAHIM, E. N. - Long-term treatment with glucocorticoids increases synthesis and stability of junctional acetylcholine receptors on innervated cultured human muscle. **J. Neurochem.** **60**: 1929-1935, 1993.
- Brown, G. L. - The neuromuscular junction. *J. Physiol* **92**: 22P, 1938.
- BÜLBRING, E. - Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmacol.** **1**: 38-61, 1946.
- CATTERAL, W. A. - Neurotoxins that act on the voltage sensitive sodium channels in excitable membranes. **Ann Rev. Pharmac. Toxicol.** **20**: 15-43, 1980.

- CHANG, C. C. & LEE, C. Y. - Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their mode of neuromuscular blocking action. **Arch. Int. Pharmacodyn.** **144**: 241-257, 1963.
- CHEN, I. L. & LEE, C. Y. - Ultra structural changes in the motor nerve terminals caused by β -bungarotoxin. **Virch. Arch. B. Zellpath.** **6**: 318-325, 1970.
- CHOKROVERTY, S.; REYES M., G.; CHOKROVERTY, M.; KAPLAN, R. - Effect of prednisolone on motor end-plate fine structure: a morphometric study in hamsters. **Ann. Neurol.** **3**: 358-365, 1978.
- CRUZ-HÖFLING, M. A. & RODRIGUES-SIMIONI, L. - *In vitro* Studies of the ultrastructural changes induced by guanidine in the nerves, muscle fibers and neuromuscular junction of the mouse diaphragm. **Gen. Pharmacol.** **30**: 705 – 711, 1998.
- DALKARA, T. & ONUR, R. - Facilitatory effects of dexamethasone on neuromuscular transmission. **Exp. Neurol.** **95**: 116-125, 1987.
- DENGLER, R.; RUDEL, R.; WARELAS, J.; BIRNBERGER, K. L. - Corticosteroids and neuromuscular transmission: electrophysiological investigation of the effects of prednisolone on

normal and anticholinesterase-treated neuromuscular junction.

Pflugers Arch. 380: 145-151, 1979.

DRAKONTIDES, A. B. - The effect of glucocorticoid treatment on denervated rat hemidiaphragm. **Brain Res. 239:** 175-189, 1982.

DURANT, N. N.; BRISCOE, J. R.; KATZ, R. L. - The effects of acute and chronic hydrocortisone treatment on neuromuscular blockade in the anesthetized cat. **Anesthesiol. 61:** 144-150, 1984.

ENGEL, W. K. & WARMOLTS, J. R. - Myasthenia gravis: a new hypothesis of the pathogenesis and a new form of treatment. **Ann. N. Y. Acad. Sci. 183:** 72-87, 1971.

ENGEL, W. K. - Myasthenia gravis, corticosteroids, anticholinesterases. **Ann. N.Y. Acad. Sci. 274:** 623-629, 1976.

FAHIM, M. A. - Chronic corticosterone treatment-induced ultra structural changes at rat neuromuscular junction. **Anat. Rec. 242:** 424-431, 1995.

FAHIM, M. A. & ADONIAM, M. H. - Effects of chronic corticosterone treatment on the morphology of rat neuromuscular junctions. **Anat.**

Rec. 227: 132-137, 1990.

FATT, P. & KATZ, B. - An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. **J. Physiol.** **115:** 320-370, 1951.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. - Os hormônios adrenocorticais. Química da secreção adrenocortical **In:** _ - **Tratado de fisiologia médica.** 9º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997. p. 872-882.

HALL, E. D. - Direct effect of glucocorticoids on neuromuscular function. **Clin. Neuropharmacol.** **6:** 169-183, 1983.

HOFMANN, W. W. - Antimyasthenic action of corticosteroids. **Arch. Neurol.** **34:** 356-360, 1977.

HONG, S. J. & CHANG, C. C. - Facilitation by 3,4-diaminopyridine of regenerative acetylcholine release from mouse motor nerve. **Br. J. Pharmacol.** **101:** 793-798, 1990.

KARLSON, P., GEROK, W., GROSS, W., HOXTER, G. - Hormônios do córtex supra-renal e das gônadas. **In:** _ - **Patobioquímica.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992. p. 151-168.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

- KATZUNG, B. G. - Corticosteróides supra-renais e antagonistas córtico-suprarenais. **In:** Goldfien, A. - **Farmacologia Básica e Clínica**. 5° ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994. p. 408-419.
- KIM, Y. I.; GOLDNER, M. M.; SANDERS, D. B. - Short-term effects of prednisolone on neuromuscular transmission in normal rats and those with experimental autoimmune myasthenia gravis. **J. Neurol. Sci.** **41**: 223-234, 1979.
- LEEUWIN, R. S. & VELDESEMA-CURRIE, R. D. - Direct effects of glucocorticoids at the neuromuscular junction. **Proc. B. P. S.** **12th-14th**: 144P, 1979.
- LEEUWIN, R. S.; VELDESEMA-CURRIE, R. D.; WOLTERS, E. CH. M. J. The effect of cholinesterase inhibitors and corticosteroids on rat nerve-muscle preparation treated with hemicholinium-3. **Eur. J. Pharmacol.** **50**: 393-401, 1978.
- LEEUWIN, R. S.; VELDESEMA-CURRIE, R. D.; VAN WILGENBURG, H.; OTTENHOF, M. - Effects of corticosteroids on neuromuscular blocking actions of d-tubocurarine. **Europ. J. Pharmacol.** **69**: 165-173, 1981.

LEEUWIN, R. S. & WOLTERS, E. CH. M. J. - Effects of corticosteroids on the sciatic nerve-tibialis anterior muscle of rats treated with hemicholinium-3. **Neurology** **27**: -171-177, 1977.

LUNDH, H. - Effects of 4-aminopyridine on statistical parameters of transmitter release at the neuromuscular junction. **Acta Pharmacol. Toxicol.** **44**: 343-346, 1979.

MATTHEWS, G. & WICKELGREN, W. O. - Effects of guanidine on transmitter release and neural excitability. **J. Physiol.** **266**: 69-89, 1977.

MEYERS, E. F. - Partial recovery from pancuronium neuromuscular blockade following hydrocortisone administration. **Anesthesiology** **46**: 148-150, 1977.

MOLGO, J.; LUNDH, H.; THESLEFF, S. - Potency of 3,4-diaminopyridine and 4-aminopyridine on mammalian neuromuscular transmission and the effect of pH changes. **Eur. J. Pharmacol.** **61**: 25-34, 1980.

MOZAI, T. - The effect of prednisolone on neuromuscular transmission in dogs. **Bull. Osaka Med. Sch.** **22**: 1-6, 1976.

NAMBA, T. - Corticotropin therapy in patients with myasthenia gravis.

Arch. Neurol. 26: 144-150, 1972.

PATTEN, B. M.; OLIVER, K. L.; ENGEL, W. K. - Adverse interaction between steroid hormones and anticholinesterase drugs. **Neurology**

(Minneapolis) 24: 442-449, 1974.

POLLI-LOPES, A. C.; ROSA, L. C.; BELEBONI, R. O.; PEREIRA, R. N. R.;

de VASCONCELOS, C. A. C.; MOREIRA, J. E. - Aspectos moleculares da transmissão sináptica. **Med. R. Preto 32:** 167-188.

PURO, D. G. - Glucocorticoid regulation of synaptic development. **Dev.**

Res. 8: 283-290, 1983.

RIBERA, A. B. & NASTUK, W. L. - Effects of chronic prednisolone treatment on post junctional membrane responses to agonist.

Muscle Nerve 2: 265-269, 1988.

RIGGS, J. E. - Pharmacologic enhancement of neuromuscular transmission in myasthenia gravis. **Clin. Neuropharmacol. 5:** 277-

292, 1982.

RIKER, D. K.; SASTRE, A.; BAKER, T.; ROTH, R. H.; RIKER W. F. -

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SECÃO CIRCULANTE

Regional high-affinity (^3H) choline in cat forebrain: selective increase in the caudate-putamen after corticosteroid pretreatment. **Mol. Pharmacol.** **16**: 886-99, 1979.

RIKER, F. W. JR. & STANDAERT, F. G. - The action of facilitatory drugs and acetylcholine on neuromuscular transmission. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** **135**: 163-176, 1966.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R.; KUMAR, V. Sistema músculo esquelético. In: _ - **Patologia Estrutural e Funcional**. 3° ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S. A., 1986. p. 1251-1311.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; SILVA-CARVALHO, I.; HELUANY, N. F.; LEITE, G. B.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; BALLEJO, G.; CORRADO A. P. - Novel effects of guanidine on the neuromuscular junction. **Gen. Pharmacol.** **28**: 599-605, 1997.

ROWAN, E. G. & HARVEY, A. L. - Potassium channel blocking actions of β -bungarotoxin and related toxins on mouse and frog motor nerve terminals. **Br. J. Pharmacol.** **94**: 839-847, 1988.

SHAPIRO, M. S.; NAMBA, T.; GROB, D. - The effect of corticotropin on the neuromuscular junction. **Neurology (Minneapolis)** **18**: 1018-1022,

1968.

SIECK, G. C.; VAN BALKOM, R. H.; PRAKASH, Y. S.; ZHAN W. Z. & DEKHUIJZEN, P. N. - Corticosteroids effects on diaphragm neuromuscular junctions. **J. Appl. Physiol.** **86**: 114-122, 1999.

SILVA, P. - Corticosteróides. In: Spínola, P. G. - **Farmacologia**. 3º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., 1989. p. 762-775.

TORDA, C. & WOLFF, H. G. - Effect of pituitary hormones, cortisone and adrenalectomy on some aspects of neuromuscular function and acetylcholine synthesis. **Am. J. Physiol.** **169**: 140-149, 1952.

TUNCBAY, T. O.; KETEL, W. B.; BOSHES, B. - Cortisone effects on myoneural junction. **Neurology** **15**: 307-314, 1965.

VAN WILGENBURG, H. - The effect of prednisolone on neuromuscular transmission in the rat diaphragm, **Eur. J. Pharmacol.** **55**: 355-361, 1979.

VAN WILGENBURG, H.; DJIE NJIO, K.; BELLING, G. A. C.; VAN DEN HOVEN, S. - Effects of corticosteroids on the myoneural junction. A morphometric and electrophysiological study. **Eur. J. Pharmacol.**

84: 129-127, 1982.

VELDESEMA-CURRIE, R.D.; VAN WILGENBURG, H.; LABRUYÈRE, W. TH.; LANGERMEIJER, M. W. E. - Presynaptic, facilitatory effects of the corticosteroid dexamethasone in rat diaphragm: modulation by beta-bungarotoxin. **Brain Res. 294:** 315-325, 1984.

VELDESEMA-CURRIE, R. D.; WOLTERS, E. CH. M. J.; LEEUWIN, R. S. - The effect of corticosteroids and hemicholinium-3 on choline uptake and incorporation into acetylcholine in rat diaphragm. **J. Pharmacol. 35:** 39p, 1976.

WARMOLTS, J. R. & ENGEL, W. K. - Benefit from alternate-day prednisone in myasthenia gravis. **N. Engl. J. Med. 286:** 17-20, 1972.

WARMOLTS, J. R.; ENGEL, W. K.; WHITAKER, J. N. - Alternate day prednisone in a patient with myasthenia gravis. **Lancet 2:** 1198-1199, 1970.

WILSON, R. W.; WARD, M. D.; JOHNS, T. R. - Corticosteroids: a direct effect at the neuromuscular junction. **Neurology (Minneap.) 24:** 1091-1095, 1974.

WOLTERS, E. CH. M. J.; LEEUWIN, R. S.; VAN WIJNGARDEN, G. K. The effect of prednisolone on the rat phrenic nerve-diaphragm preparation treated with hemicholinium. **Eur. J. Pharmacol.** **29**: 165-169, 1974.

WOLTERS, E. CH M. J. & LEEWIN R. S. - Antagonism of corticosteroids against lethal effects of hemicholinium-3 in rats and mice. **Eur. J. Pharmacol.** **33**: 145-149, 1975.

WOLTERS, E. CH. M. J. & LEEUWIN, R. S. - The effect of corticosteroids on the phrenic nerve-diaphragm preparation treated with hemicholinium-3, a possible model for myasthenia gravis. **Neurology** **26**: 574-578, 1976.

YEH, J. Z.; OXFORD, G. S.; WU, C. H.; NARAHASHI, T. - Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. **Biophys. J.** **16**: 77-80, 1976.