



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**RECEPTORES  $A_{2A}$  REDUZEM A FADIGA INDUZIDA POR NEOSTIGMINA  
DIMINUINDO TANTO A DESSENSIBILIZAÇÃO DOS RECEPTORES PRÉ  
SINÁPTICOS NICOTÍNICOS, QUANTO O EFEITO INIBITÓRIO GERADO PELA  
ATIVÇÃO DOS RECEPTORES  $M_2$  NO TERMINAL NERVOSO MOTOR**

**MARINGÁ- PR**  
**2017**

**PEDRO HENRIQUE MARQUES ANDREO**

**RECEPTORES A<sub>2A</sub> REDUZEM A FADIGA INDUZIDA POR NEOSTIGMINA  
DIMINUINDO TANTO A DESSENSIBILIZAÇÃO DOS RECEPTORES PRÉ  
SINÁPTICOS NICOTÍNICOS, QUANTO O EFEITO INIBITÓRIO GERADO PELA  
ATIVÇÃO DOS RECEPTORES M<sub>2</sub> NO TERMINAL NERVOSO MOTOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Alves-Do-Prado  
Coorientadora: Prof. Dra Celia Regina Ambiel da Silva

**MARINGÁ-PR**

**2017**

**PEDRO HENRIQUE MARQUES ANDREO**

**RECEPTORES A<sub>2A</sub> REDUZEM A FADIGA INDUZIDA POR NEOSTIGMINA  
DIMINUINDO TANTO A DESSENSIBILIZAÇÃO DOS RECEPTORES PRÉ  
SINÁPTICOS NICOTÍNICOS, QUANTO O EFEITO INIBITÓRIO GERADO PELA  
ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES M<sub>2</sub> NO TERMINAL NERVOSO MOTOR**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em: .....de.....de.....

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Wilson Alves-Do-Prado  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof. Dra. Cecília Edna Mareze da Costa  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof. Dra. Elaine Campana Sanches Bornia  
UniCesumar

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço principalmente a Deus por ter me dado saúde, força e me guiar em uma profissão que possibilita contribuir para o desenvolvimento do conhecimento científico.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e incentivaram a buscar o conhecimento.

Ao meu orientador Wilson Alves-Do-Prado, pela seriedade e desafio proposto. À minha coorientadora Celia Regina Ambiel da Silva, pela paciência em todos os momentos de dúvidas; pelo apoio durante a preparação, realização e finalização desse trabalho.

Muito obrigado!

Andreo, Pedro Henrique Marques. **Receptores  $A_{2A}$  reduzem a fadiga induzida por neostigmina diminuindo tanto a dessensibilização dos receptores pré sinápticos nicotínicos, quanto o efeito inibitório gerado pela ativação dos receptores  $M_2$  no terminal nervoso motor.**

2017. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Maringá – Maringá, 2017.

## RESUMO

A fadiga induzida por neostigmina tem origem no terminal nervoso motor. Ela seria causada pela ação da neostigmina ao determinar um acúmulo de moléculas de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica. Tal acúmulo, por sua vez, levaria à ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos inibitórios do subtipo  $M_2$  ( $R_{M_2}$ , acoplados à proteína G) do terminal nervoso motor. Como a neostigmina não é um inibidor “puro” da acetilcolinesterase (AChE), uma vez que também pode dessensibilizar os receptores nicotínicos neuronais ( $R_{Nn}$ , facilitatórios) e, levando em conta que os receptores inibitórios  $R_{M_2}$  e os receptores de adenosina do subtipo  $A_{2A}$  ( $R_{ADA2A}$ ) do terminal nervoso motor desempenham papéis no  $TOF_{fade}$  (2.0 Hz aplicado durante 2s) induzido por neostigmina, no presente trabalho foram investigados os papéis dos receptores pré-sinápticos facilitatórios  $R_{Nn}$  (expressando subunidades  $\alpha 3\beta 2$  e bloqueados seletivamente pelo hexametônio) e  $R_{ADA2A}$  (bloqueados por ZM 241385) na fadiga induzida por neostigmina em preparações de nervo frênico músculo diafragma isolado de ratos, indiretamente estimuladas com pulsos de 50,0 Hz. Como os efeitos causados pelas ativações  $R_{ADA2A}$  e  $R_{M_2}$  são mediados pela adenilato-ciclase (AC), a influência do forskolin na fadiga induzida pela neostigmina também foi pesquisada. Hexametônio, metoctramina, ZM 241385 e forskolin reduziram a fadiga causada por 0.10  $\mu$ M de neostigmina. Os dados sugerem que a forma da fadiga tetânica causada pela neostigmina parece ser proporcionada tanto pela dessensibilização dos  $R_{Nn}$  ( $\alpha 3\beta 2$ , facilitatórios) como pela ativação dos  $R_{M_2}$  devido ao acúmulo de neostigmina e ACh, respectivamente. Estes efeitos podem ser mediados pela proteína quinase A (PKA) (através da ativação de  $R_{ADA2A}$  que reduz a dessensibilização dos  $R_{Nn}$ ) e ativação de AC (reduz o efeito inibitório de  $R_{M_2}$ ) no nervo motor.

**Palavras chave:** junção neuromuscular, neostigmina, fadiga, receptores nicotínicos, receptores de adenosina, receptores muscarínicos.

Andreo, Pedro Henrique Marques. **A<sub>2A</sub> receptors reduce fade induced by neostigmine decreasing both desensitization of presynaptic nicotinic receptors and the inhibitory effect generated by activation of M<sub>2</sub> receptors on the motor nerve terminal**

2017. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas – Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá – Maringá, 2016.

## ABSTRACT

The neostigmine-induced fade has origin on the motor nerve terminal, and it would be caused by activation of G-protein-coupled cholinergic (C) muscarinic (M) inhibitory M<sub>2</sub> receptors (inhibitory R<sub>M2</sub>) on motor nerve by acetylcholine molecules accumulated at synaptic cleft by anticholinesterase (AChE) action of neostigmine. Since neostigmine is not a pure acetylcholinesterase inhibitor, as neostigmine can also desensitize neural nicotinic receptors (R<sub>Nn</sub>), and taken into account that inhibitory R<sub>M2</sub> and A<sub>2A</sub> receptors (R<sub>ADA2A</sub>) on motor nerve terminal play key roles in the neostigmine-induced TOF<sub>fade</sub> (2.0 Hz applied during 2s), the roles of presynaptic facilitatory R<sub>Nn</sub> (expressing  $\alpha_3\beta_2$  subunits and selectively blocked by hexamethonium) and R<sub>ADA2A</sub> (blocked by ZM 241385) in the neostigmine-induced fade were researched in the phrenic nerve diaphragm muscle preparations of rats indirectly stimulated at 50 Hz. As the effects caused by R<sub>ADA2A</sub> and inhibitory R<sub>M2</sub> activations are mediated by adenylate-cyclase (AC), the influence of forskolin in the neostigmine-induced fade was also researched. Hexamethonium, methoctramine, ZM 241385, and forskolin reduced the fade caused by 0.10  $\mu$ M neostigmine. The neostigmine-induced fade was not only prevented, as it was turned in facilitation, by previous treatment of preparation with forskolin or with simultaneous administration of hexamethonium and methoctramine. Data suggest that the shape of tetanic fade caused by neostigmine seems to be caused by both desensitization of facilitatory R<sub>Nn</sub> ( $\alpha_3\beta_2$ ) and activation of inhibitory R<sub>M2</sub> on motor nerve by neostigmine and acetylcholine accumulation, respectively. These effects seem to be mediated by protein kinase A (PKA) (via R<sub>ADA2A</sub> activation reducing desensitization of facilitatory R<sub>Nn</sub>) and AC activation (reducing effect of inhibitory R<sub>M2</sub>) on motor nerve.

**Keywords:** neostigmine, fade, nicotinic receptors, adenosine receptors, muscarinic receptors, forskolin, neuromuscular junction.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ilustração do funcionamento dos receptores pré-sinápticos.....	12
<b>Figura 2.</b>	Funcionamento dos receptores pré-sinápticos em diferentes Hz.....	14
<b>Figura 3.</b>	Representação da exérese do nervo frênico e hemidiafragma.....	16
<b>Figura 4.</b>	Identificação das estruturas.....	17
<b>Figura 5.</b>	Registro miográfico e medidas analisadas.....	18
<b>Figura 6.</b>	Registros miográficos e perfis das contrações musculares.....	20
<b>Figura 7.</b>	Efeitos da neostigmina; metoctramina e hexametônio.....	21
<b>Figura 8.</b>	Efeitos da neostigmina; pirenzepina, ZM 241385, oxotremorina.....	22
<b>Figura 9.</b>	Efeitos da neostigmina e forskolin.....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
AC	Adenilato ciclase
AD	Adenosina
AMP <sub>c</sub>	Monofosfato cíclico de adenosina
BNMND	Bloqueadores neuromusculares não despolarizantes
FAS-I	Fasciculín-I
FORSK	Forskolin
Hz	Frequência em Hertz
HEX	Hexametônio
mN	Mili Newton
μM	Micro Molar
MTC	Metocramina
nM	Nano Molar
NEO	Neostigmina
OXO	Oxotremorina
PKA	Proteína quinase A
PZP	Pirenzepina
R <sub>COLIN</sub>	Receptores colinérgicos
R <sub>AD</sub>	Receptores de adenosina



$R_{ADA1}$	Receptores de adenosina subtipo $A_1$
$R_{ADA2A}$	Receptores de adenosina subtipo $A_2A$
$R_{Nn}$	Receptor nicotínico neuronal (subunidades $\alpha 3\beta 2$ )
$R_{Nm}$	Receptores nicotínicos musculares
$R_M$	Receptor muscarínico
$\bar{R}_{M2}$	Receptor muscarínico subtipo 2 (inibitório)
$^+R_{M1}$	Receptor muscarínico subtipo 1 (facilitatório)
$PIP_3$	Fosfatidilinositol-trifosfato
T	Tempo
$TRANSP_{colina}$	Transportadores de colina

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	11
OBJETIVO .....	16
MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
AGENTES UTILIZADOS.....	19
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSSÃO .....	24
CONCLUSÃO .....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28

## INTRODUÇÃO

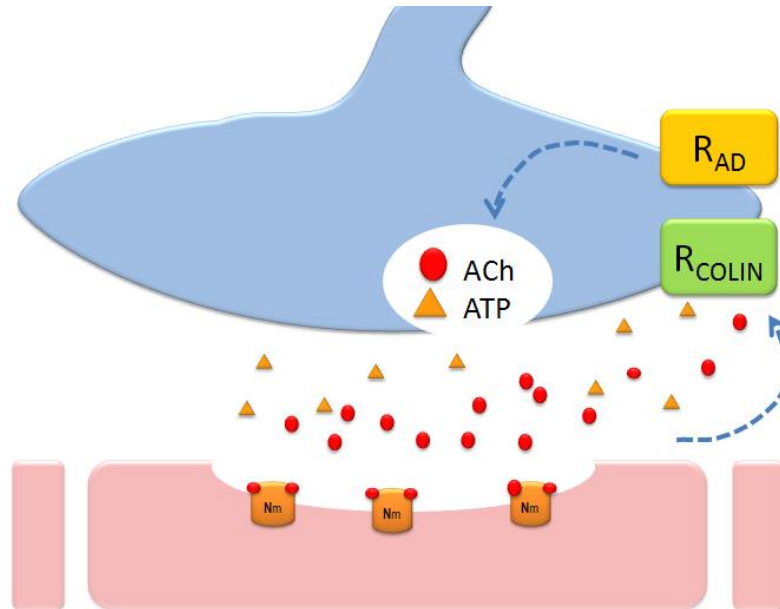
A região especializada onde um neurônio se comunica com outra célula, seja ela um neurônio ou não, é chamada de sinapse (do grego *synapsis*, “unir”), sendo esta fundamental para diversas funções orgânicas (KOEPPEN e STANTON 2009; BRITTO, 2009).

Muito do que atualmente se compreende sobre a função das sinapses tem como base o estudo da transmissão sináptica na junção neuromuscular, visto que este é um local ideal para investigar a sinalização química, já que é um modelo relativamente simples e acessível à experimentação (KANDEL et al., 2014).

As fibras musculares esqueléticas são inervadas por fibras nervosas mielinizadas, provenientes dos neurônios motores dos cornos anteriores da medula espinal (PURVES et al., 2007). O neurônio motor inerva o músculo em uma área da membrana muscular denominada de placa motora (região onde estão os receptores nicotínicos musculares,  $R_{Nm}$ ), onde o axônio perde a bainha de mielina e se divide em ramos conhecidos como botões sinápticos, por onde o neurônio libera o neurotransmissor (KANDEL et al., 2014).

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor responsável pelas transmissões neuromusculares (BOWMAN et al., 1990; WESSLER et al., 1986). Contudo, outras moléculas, como as de adenosina (AD), que são provenientes da defosforilação do ATP coliberado com a ACh, possuem papel importante, garantindo a eficiência da transmissão neuromuscular (CORREIA-DE-SÁ et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2002).

Estudos farmacológicos e imunohistoquímicos demonstram que receptores colinérgicos ( $R_{COLIN}$ ), assim como de adenosina ( $R_{AD}$ ) estão presentes nos terminais nervosos motores. Tais receptores podem controlar ( $R_{COLIN}$ ) (auto-regulação) ou modular ( $R_{AD}$ ) (auto-modulação) a liberação da ACh a partir dos nervos motores (COLQUHOUN et al., 1989; WESSLER et al., 1986; ALVES-DO-PRADO, 2011) (figura 1).



**Figura 1.** Ilustração do funcionamento da auto-regulação ( $R_{COLIN}$ ) e auto-modulação ( $R_{AD}$ ) dos receptores pré-sinápticos sobre a liberação de ACh.

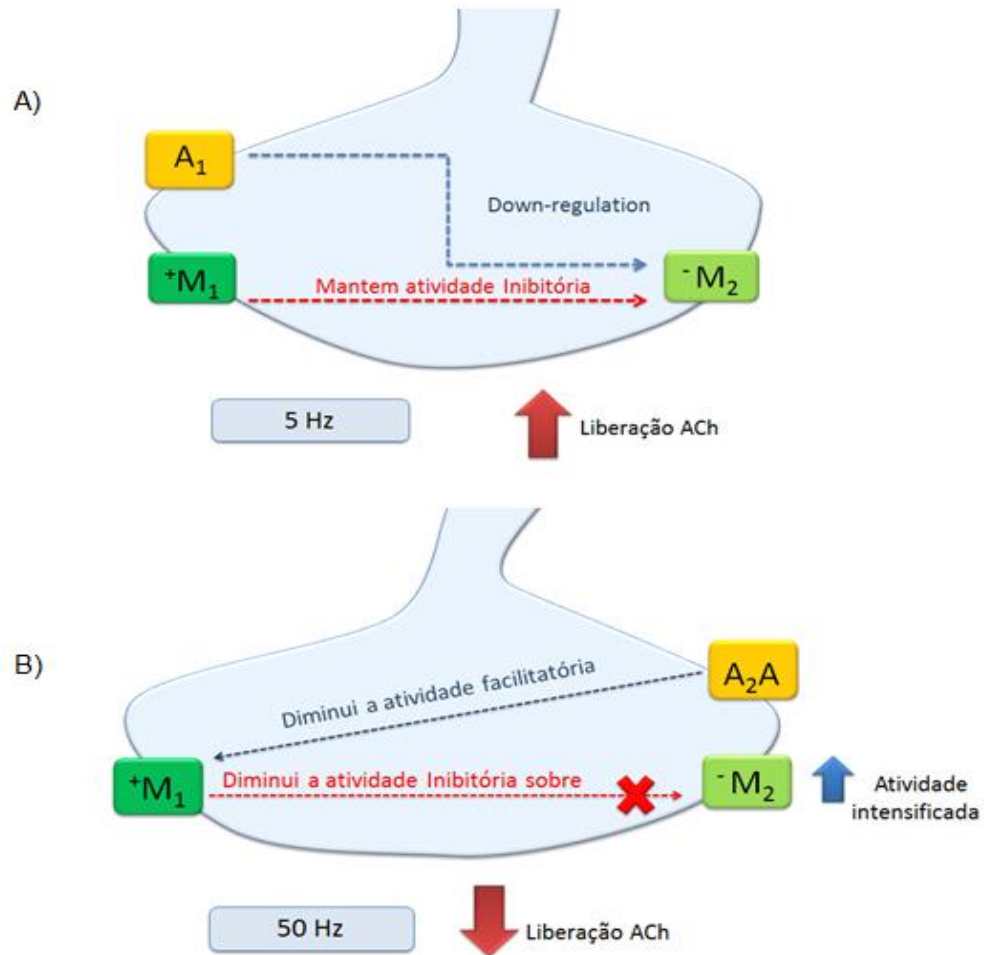
Os receptores colinérgicos dos terminais nervosos motores podem ter atividades facilitatórias ( $^+R_{COLIN}$ ) ou inibitórias ( $^-R_{COLIN}$ ) sobre a liberação da ACh e têm sido identificados como sendo do tipo nicotínico (N) neuronal ( $N_n$ , expressam subunidades  $\alpha_3\beta_2$ ) ou muscarínicos (M) dos subtipos  $M_1$  e  $M_2$  (FARIA et al., 2003; ALVES-DO-PRADO, 2011). Os receptores nicotínicos neuronais e os receptores muscarínicos  $M_1$  aumentam ( $^+R_{N_n}$ ,  $^+R_{M_1}$ ), enquanto os receptores  $M_2$  reduzem ( $^-R_{M_2}$ ), a liberação de ACh a partir do terminal nervoso motor (ALVES-DO-PRADO, 2011; WESSLER, 1989). A ação facilitatória dos receptores  $M_1$  acontece com a participação da proteína  $G_q$  que, por meio do segundo mensageiro  $IP_3$  (inositol trifosfato), aumenta o  $Ca^{2+}$  intracelular, o que estimula a liberação de ACh. Já os receptores  $M_2$  estão acoplados à proteína  $G_i$  que, por sua vez, inibe a síntese de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) pela inibição da adenilato-ciclase (AC), levando a uma redução do  $Ca^{2+}$  intracelular e, conseqüentemente, uma redução na liberação de ACh (BROWN; LAIKEN, 2012).

As atividades desses  $R_{COLIN}$  pré-sinápticos são influenciadas pela atividade do nervo motor e, portanto, dependem da frequência de estimulação e da duração dos pulsos elétricos que são aplicados sobre o nervo (OLIVEIRA et al., 2002). Nesse sentido, foi possível observar a ocorrência de ativações preferenciais dos receptores  $M_1$  ( $^+R_{M_1}$ ) quando baixas frequências (~5,0 Hz) de estimulação estão sendo

aplicadas sobre o nervo motor, já que em tais condições os receptores nicotínicos neuronais ( ${}^+R_{Nn}$ ) são rapidamente dessensibilizados (COLQUHOUN et al., 1989; WESSLER et al., 1986). Por outro lado, quando o terminal nervoso passa a receber frequências de estimulação mais elevadas ( $\geq 50,0$  Hz), há predominância de atividade dos receptores muscarínicos inibitórios  $M_2$  ( ${}^-R_{M2}$ ).

Além dessas ações tônicas provenientes das atividades dos receptores muscarínicos  $M_1$  ( ${}^+R_{M1}$ ) e muscarínicos  $M_2$  ( ${}^-R_{M2}$ ) do terminal nervoso motor, também ocorrem participações de controles mais refinados sobre a liberação de ACh. Tais controles são exercidos pelos receptores de adenosina ( $R_{AD}$ ) do subtipo  $A_1$  e  $A_{2A}$  os quais, quando ativados pela adenosina presente na fenda sináptica, podem diminuir ( ${}^-R_{ADA1}$ ) ou aumentar ( ${}^+R_{ADA2A}$ ) a liberação de ACh do nervo motor. Os níveis de adenosina na fenda sináptica indicarão qual  $R_{AD}$  será preferencialmente ativado, uma vez que na vigência de baixas frequências ( $\sim 5,0$  Hz) de estímulo aplicadas sobre o nervo motor existem níveis baixos de adenosina (AD) na fenda sináptica e esta condição determina a ativação preferencial dos receptores de adenosina  $A_1$  ( ${}^-R_{ADA1}$ ) (CORREIA-DE-SÁ et al., 1996) (figura 2. A).

Em contraste, ocorre uma ativação preferencial dos receptores de adenosina  $A_{2A}$  ( ${}^+R_{ADA2A}$ ) quando frequências de estimulação tetanizantes ( $\geq 50,0$  Hz) são aplicadas sobre o nervo motor (CORREIA-DE-SÁ et al., 1996). Além disso, tem sido demonstrado que podem ocorrer conversas cruzadas (*cross-talking*) entre os receptores muscarínicos  $M_1$  ( ${}^+R_{M1}$ ), muscarínicos  $M_2$  ( ${}^-R_{M2}$ ) e de adenosina  $A_{2A}$  ( ${}^+R_{ADA2A}$ ), já que a ativação de  $M_1$  reduz a atividade de  $M_2$  e a atividade de  $M_1$ , por sua vez, pode ser reduzida quando os receptores  $A_{2A}$  estão sendo plenamente ativados pela adenosina (AD) liberada do nervo e da musculatura esquelética (OLIVEIRA et al., 2002). Essa “conversa cruzada”, que ocorre no interior do terminal, é conduzida pela atividade de segundos mensageiros, tais como o  $IP_3$  ( ${}^+R_{M1}$ ) e AMPc ( ${}^-R_{M2}$ ,  ${}^+R_{ADA2A}$ ) (OLIVEIRA et al., 2002) (figura 2.B).



**Figura 2:** Representações da auto-regulação colinérgica pelos receptores muscarínicos facilitatórios ( $+R_{M1}$ ) e inibitórios ( $-R_{M2}$ ), assim como a auto-modulação pelos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  na vigência de baixas (A) e altas (B) frequências de estímulo (ALVES-DO-PRADO, 2011; OLIVEIRA et al., 2002).

Concomitantemente a essas complexas interações acima descritas, está também ocorrendo a hidrólise das moléculas de ACh que foram liberadas para a fenda sináptica. Nessas circunstâncias, as moléculas de ACh são metabolizadas para acetato e colina pela ação da acetilcolinesterase (AChE) (SOREQ; SEIDMAN, 2001). A colina, assim formada, é recapturada para o terminal colinérgico através da ação de transportadores de colina ( $TRANSP_{colina}$ ) (FERGUSON; BLAKELY, 2004). Estes transportadores de colina são tão importantes para a eficiência da transmissão neuromuscular que a falta de eficiência desses sistemas ( $TRANSP_{colina}$ ) determina graves reduções nas quantidades de ACh liberadas dos terminais colinérgicos (FERGUSON; BLAKELY, 2004). Por outro lado, há uma estreita correlação entre a liberação de ACh e atividade dos  $TRANSP_{colina}$ , já que ocorre aumento nas

atividades dos  $\text{TRANSP}_{\text{colina}}$  quando o terminal nervoso motor está com sua atividade aumentada, ou seja, liberando mais ACh (KUHAR; MURRIN, 1978).

Na prática anestesiológica utilizam-se agentes anticolinesterásicos, principalmente a neostigmina, para reverter o bloqueio da transmissão neuromuscular causada por bloqueadores neuromusculares não despolarizantes (BNMND), posto que os BNMND interagem competitivamente com os receptores nicotínicos da placa motora (HIBBS; ZAMBON, 2012). Dessa forma, o aumento do tempo de permanência da ACh na fenda sináptica, o qual é causado pela ação inibitória da neostigmina sobre a AChE, reverte à ação dos BNMND sobre os receptores nicotínicos da placa motora.

Devido a tal eficiência clínica, a neostigmina é um dos agentes anticolinesterásicos mais estudados em farmacologia quando o foco do estudo é o mecanismo (ou mecanismos) de ação, através do qual (ou dos quais), a neostigmina atua (TAYLOR, 2012). Todavia, tem-se verificado que a neostigmina não é uma ferramenta farmacológica “limpa”, já que outros mecanismos de ação, tais como atividade direta nos receptores nicotínicos, e a elevada capacidade para bloquear a butirilcolinesterase (BChE), têm sido também identificados nas moléculas de neostigmina (TAYLOR, 2012; SHERBY et al., 1985). Além disso, quando preparações neuromusculares na presença de neostigmina são indiretamente estimuladas com frequências elevadas ( $\geq 50,0$  Hz), um fenômeno denominado de fadiga pode ser observado. Este último caracteriza-se por mostrar um perfil de contração muscular de alta intensidade que esta sempre acompanhada por uma perda da sua capacidade de sustentação (ALVES-DO-PRADO, 2011).

Deste modo, conhecer a participação de cada componente funcional da transmissão neuromuscular (receptores pré-sinápticos para ACh e AD) na indução de fadiga de transmissão causada por neostigmina é extremamente relevante para a compreensão fisiológica da neurotransmissão e para um melhor gerenciamento do uso clínico da neostigmina.

## OBJETIVO

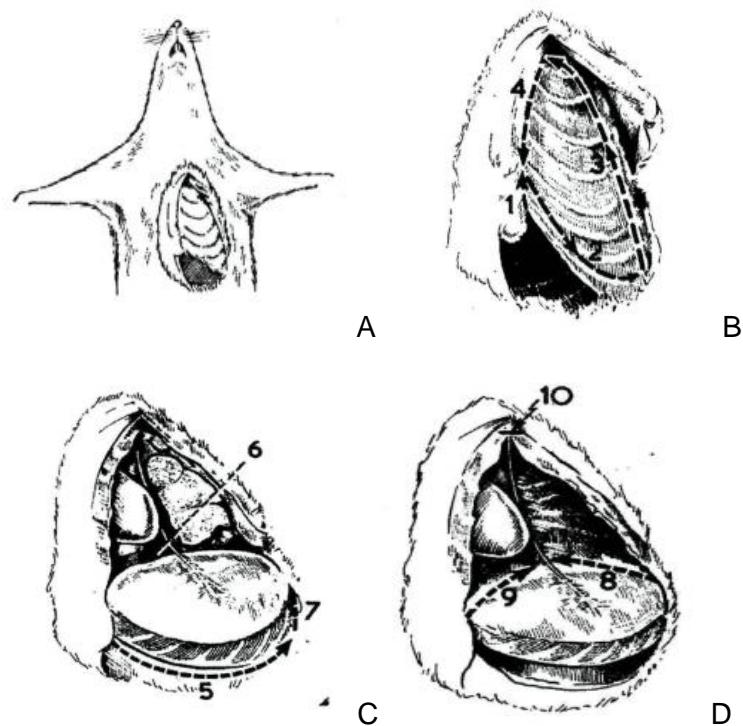
No presente estudo investigamos os papéis dos receptores nicotínicos neuronais pré-sinápticos ( $R_{Nn}$ ;  $\alpha3\beta2$ ), receptores muscarínicos pré-sinápticos  $M_1$ , receptores muscarínicos pré-sinápticos  $M_2$  e receptores pré-sinápticos  $R_{ADA2A}$  na fadiga causada pela neostigmina em preparações neuromusculares indiretamente estimuladas com frequências fisiológicas (50,0 Hz).

## MATERIAIS E MÉTODOS

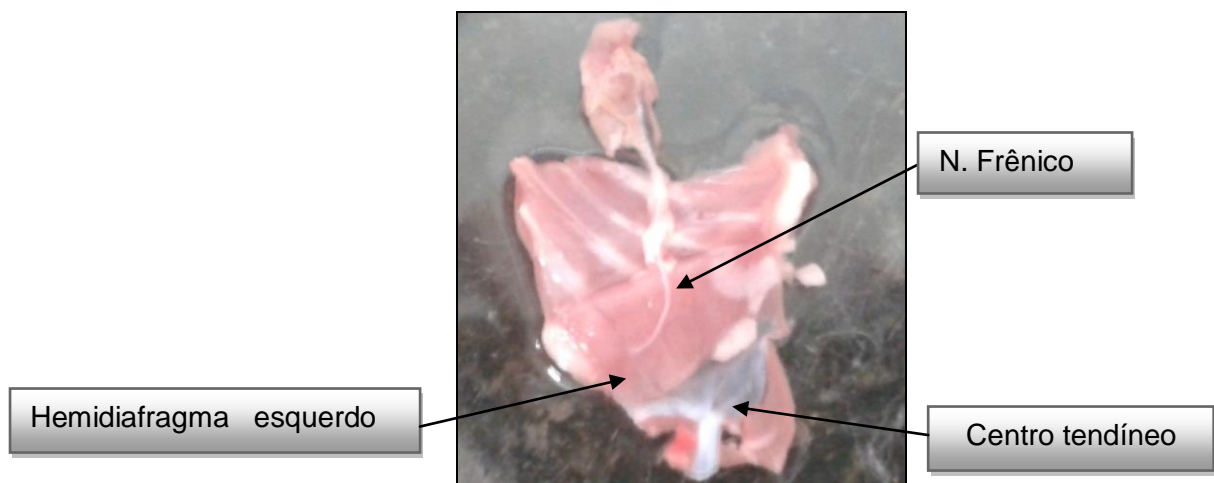
Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá, sob o protocolo nº 7781201016.

Ratos machos Wistar (250g) sofreram eutanásia por meio de injeção intraperitoneal de tiopental (120 mg/Kg), precedida por uma injeção intraperitoneal de lidocaína (10 mg/Kg). As preparações nervo frênico diafragma isolado de ratos foram montadas de acordo com o método proposto inicialmente por Bülbring (1946) e posteriormente modificado e utilizado amplamente pela comunidade europeia (OLIVEIRA et al., 2015; CORREIA-DE-SÁ et al., 1996, FARIA et al., 2003, OLIVEIRA et al., 2002, WESSLER et al., 1986, WESSLER, 1989). Por meio de uma ampla toracotomia, o hemidiafragma esquerdo, juntamente com o nervo frênico foram isolados do animal (Figura 3 e 4).





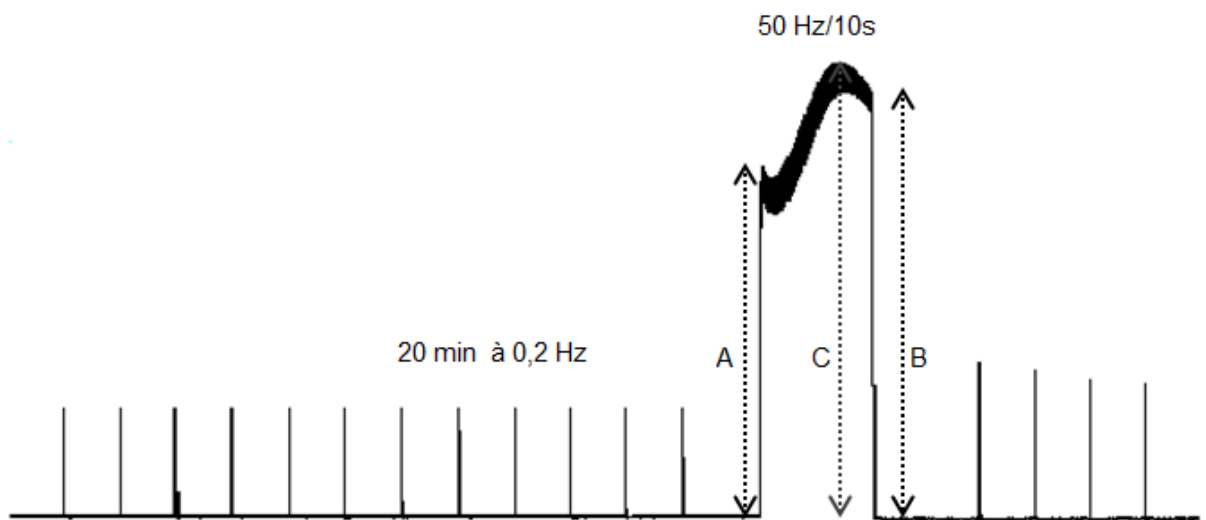
**Figura 3: Delineamento representativo do processo de exérese do nervo frênico-hemidiafragma esquerdo.** A) incisão e exposição da caixa torácica. B) toracotomia. C) exposição do frênico e diafragma D) retirada do frênico e hemidiafragma esquerdo. Fonte: Oliveira, 2006, p. 40.



**Figura 4:** Hemidiafragma esquerdo isolado do rato, juntamente com sua inervação. Destaque ao centro tendíneo onde é feita a amarração com fio de algodão.

Após exérese, a preparação neuromuscular foi imersa em uma câmara de 30 mL contendo tampão de Krebs (composição em mmol/L) (NaCl 110,0; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 3,0; MgCl<sub>2</sub> 1,3; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0; glucose 11,1) a 37°C e continuamente airado com um mistura de oxigênio (95%) e dióxido de carbono (5%). Um fio de

algodão foi amarrado ao centro tendíneo (figura 4) do hemidiafragma e ligado a um transdutor de força isométrica (Grass FT 03, Grass Instruments Division, West Warwick, RI, EUA). As respostas de contração muscular foram registradas continuamente a uma tensão de repouso de 50 mN, com um sistema de aquisição de dados PowerLab (Software Gráfico; Instrumentos AD, Castle Hill, NSW, Austrália). O nervo frênico foi estimulado por um eletrodo de platina bipolar (pulsos retangulares supramáximos, 0,05 ms). As preparações foram estimuladas indiretamente a 0,2 Hz durante 20 min (equilíbrio da preparação). Posteriormente, o nervo frênico recebeu estímulos com frequência de 50,0 Hz (durante 10 segundos) sendo estes intercalados, por intervalos de 20 minutos com frequência de estimulação de 0,2 Hz (este intervalo foi selecionado para evitar possíveis influências da estimulação tetanizante anterior sobre as subsequentes). Esta sequência foi repetida quatro vezes. A razão (R) entre tensão muscular produzida no final do estímulo de 50,0 Hz (B) e a obtida no início (A) ( $R=B/A$ ), bem como, a medida da amplitude máxima de contração muscular tetânica (C) foram usadas como parâmetros de análise (Figura 5).



**Figura 5.** Registro miográfico obtido com a estimulação com frequência de 50,0 Hz, aplicada sobre o nervo motor. Os parâmetros A, B e C foram medidos e analisados.

Os valores de R foram obtidos nos primeiros, segundos, terceiros e quartos estímulos tetanizantes (5, 25, 45 e 65 min após o primeiro estímulo tetânico, controle), respectivamente. Após verificação, foi selecionado para análise o tétano em que os agentes produziram maior efeito.

## AGENTES UTILIZADOS

As menores concentrações dos agentes anticolinesterásicos neostigmina (NEO; 0.50  $\mu\text{M}$ ); fasciculín-I (FAS-I; 0.10  $\mu\text{M}$ ) e do agonista dos  $R_{M2}$  oxotremorina (OXO; 5.0  $\mu\text{M}$ ) capazes de produzir efeito nos valores de R foram pesquisadas. A menor concentração de hexametônio (HEX; 270  $\mu\text{M}$ ) antagonista dos  $R_{Nn}$ , capaz de modificar a fadiga causada pela neostigmina também foi pesquisada.

As concentrações do antagonista dos  $R_{M1}$  pirenzepina (PZP; 10 nM); antagonista dos receptores  $R_{M2}$  metoctramina (MTC; 0.10  $\mu\text{M}$ ); e o ativador de adenilato-ciclase (forskolin; 3.0  $\mu\text{M}$ ) foram aquelas reconhecidas como seletivas (BORNIA et al., 2011; MATOS SILVA et al., 2010; OLIVEIRA E CORREIA-DE-SÁ, 2005; WESSLER, 1989; CORREA-DE-SÁ e RIBEIRO., 1994). A concentração de ZM 241385 (10 nM; antagonista dos  $R_{ADA2A}$ ) escolhida, além de ser seletiva, também não é capaz de causar nenhuma alteração no perfil da contração tetânica quando administrada isoladamente (BORNIA et al. 2011).

O efeito causado pela neostigmina separadamente, ou na presença de outros agentes, foi analisado em  $T = 65$  min. Os outros agentes (pirenzepina, metoctramina, ZM 241385, hexametônio e forskolin) foram administrados 20 minutos antes da administração de neostigmina. O fasciculín-I foi utilizado como agente capaz de causar uma forma de fadiga que seria exclusivamente determinada pelo acúmulo de ACh na fenda sináptica, uma vez que esse agente é relatado como um inibidor seletivo da AChE, isto é, um agente anti-colinesterásico puro (MINIC et al., 2003).

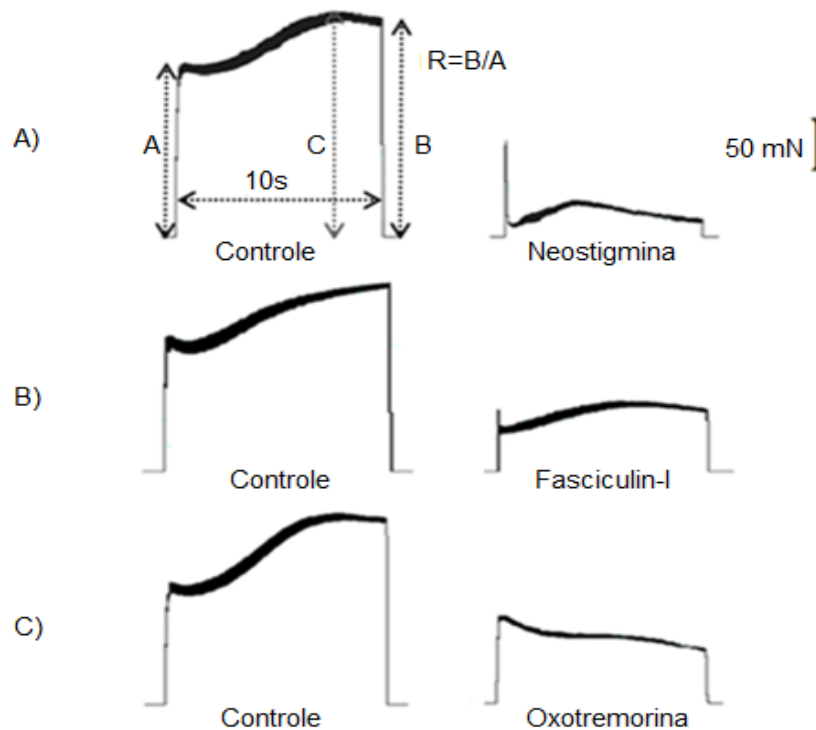
## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SEM). As magnitudes das diferenças dos valores percentuais de R (B/A) e C foram avaliadas por ANOVA, seguida pelo “*post hoc*” teste de Bonferroni ( $P < 0.05$ ).

O software utilizado para análise foi o GraphPad Prism 5.

## RESULTADOS

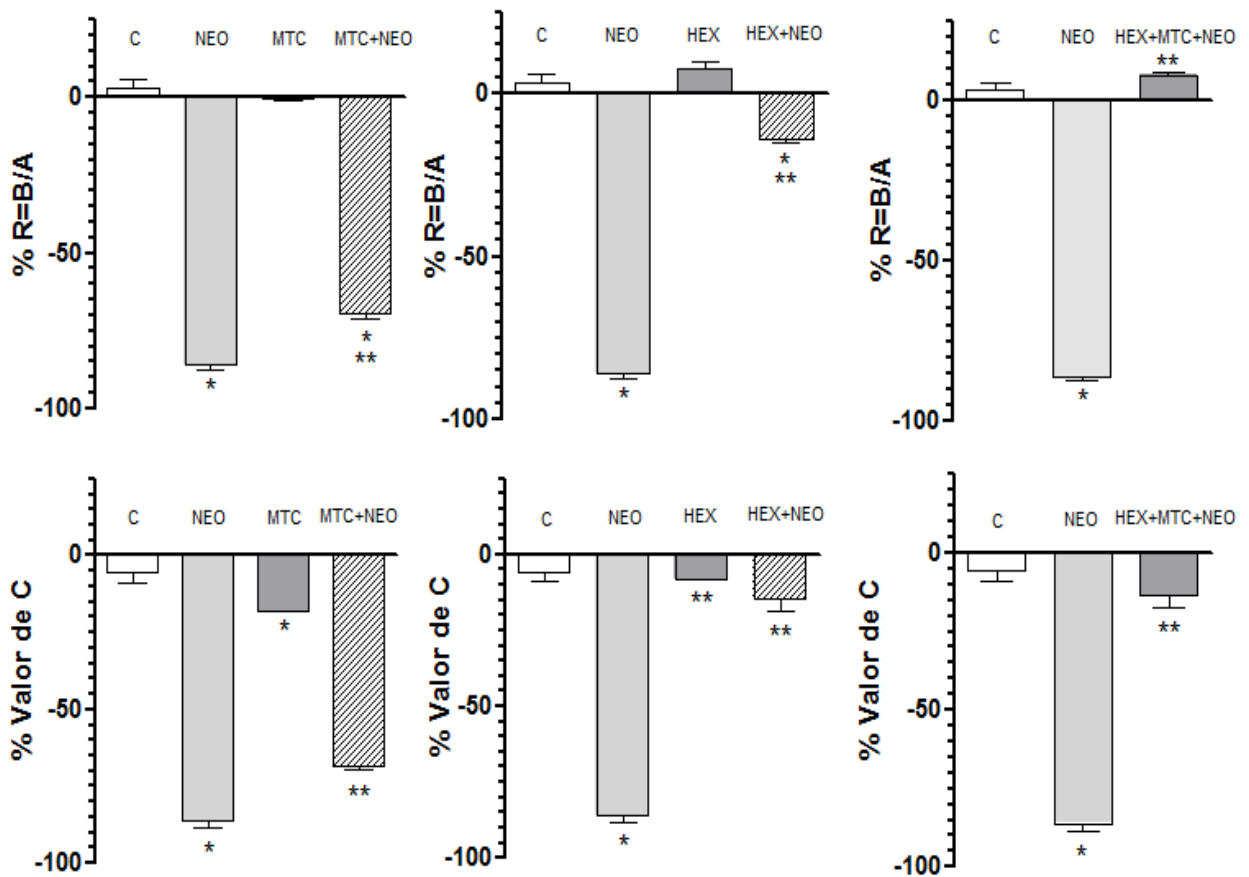
Neostigmina (0.50  $\mu\text{M}$ ), fasciculin-I (0.10  $\mu\text{M}$ ) e oxotremorina (5.0  $\mu\text{M}$ ) induziram uma fadiga (redução no valor de R) de  $-86.0 \pm 1.30\%$  (n=6),  $-26.40 \pm 1.10\%$  (n=5) e  $-50.80 \pm 1.30\%$  (n=5), respectivamente (figura 6).



**Figura 6.** Registros miográficos dos perfis das contrações musculares produzidos por Neostigmina (0.50  $\mu\text{M}$ ; n=6) (A); Fasciculin-I (0.10  $\mu\text{M}$ ; n=5) (B) e Oxotremorina (5.0  $\mu\text{M}$ ; n=5) (C), após 65 min da administração de cada droga em preparações nervo frênico-diafragma isolado de ratos indiretamente estimuladas com pulsos elétricos de 50,0 Hz, durante 10s. Valores de R (B/A) e valores de C foram os parâmetros analisados, os quais foram medidos conforme mostrado na figura A, à esquerda. Barra vertical (canto superior direito) indica força em miliNewton (mN).

A prévia administração de hexametônio (270.0  $\mu\text{M}$ ) ou metoctramina (0.10  $\mu\text{M}$ ) reduziu a fadiga causada pela neostigmina (0,50  $\mu\text{M}$ ): de  $-86.0 \pm 1.30\%$  (n=6) para  $-14.20 \pm 0.75\%$  (n=5) no caso do hexametônio e de  $-86.0 \pm 1.30\%$  (n=6) para  $-69.30 \pm 1.5\%$  (n=5) no caso da metoctramina (figura 7). Tais antagonistas também foram capazes de reduzir a queda dos valores de C induzidas pela neostigmina (0,10  $\mu\text{M}$ ): hexametônio (de  $-86.1 \pm 2.4\%$ , n=6 para  $-14.7 \pm 3.7\%$ , n=5) e metoctramina (de  $-86.1 \pm 2.4\%$ , n=6 para  $-68.6 \pm 1.2\%$ , n=5) (figura 7).

A fadiga induzida por neostigmina não foi apenas completamente prevenida (de  $-86.0 \pm 1.30\%$ ,  $n=6$  para  $7.97 \pm 0.73\%$ ,  $n=5$ ), mas foi transformada em facilitação ( $+7.97 \pm 0.73\%$ ,  $n=5$ ) com a prévia e simultânea administração de hexametônio ( $270.0 \mu\text{M}$ ) e metoctramina ( $0.10 \mu\text{M}$ ) (figura 7).

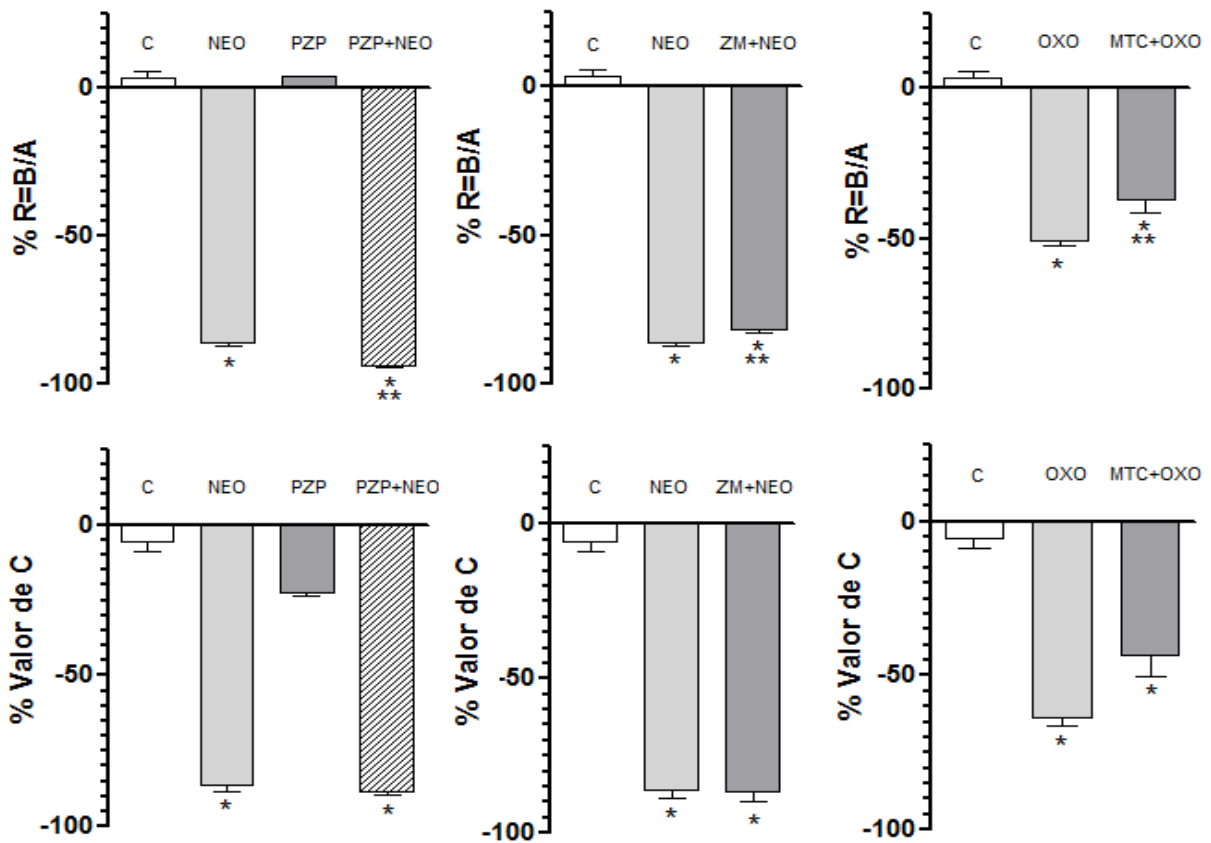


**Figura 7.** Influências do bloqueio dos receptores facilitatórios ( $^+R_{Nn}$ ;  $\alpha 3\beta 2$ ) e inibitórios ( $R_{M2}$ ) por hexametônio (HEX,  $270 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) e metoctramina (MTC,  $0.10 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ), respectivamente, na porcentagem (%) de redução nos valores de R e C causados por neostigmina (NEO,  $0.50 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ) em preparações nervo frênico-diafragma isolado de ratos indiretamente estimuladas com frequência de  $50.0 \text{ Hz}$ . O efeito causado pela administração simultânea de MTC ( $0.10 \mu\text{M}$ ) e HEX ( $270 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) na % de redução de R e de C causados por NEO ( $0.10 \mu\text{M}$ ) também é mostrado. Altura das colunas indica média  $\pm$  DP. \* valores diferentes ( $P < 0.05$ ) do controle (C; Krebs;  $n=5$ ) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni) e \*\* valores diferentes ( $P < 0.05$ ) da NEO separadamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

Quanto à redução dos valores de C induzida por neostigmina ( $0,50 \mu\text{M}$ ), a administração simultânea de hexametônio ( $270.0 \mu\text{M}$ ) e metoctramina ( $0.10 \mu\text{M}$ ) previamente à neostigmina resultou em valores de C (de  $-86.1 \pm 2.4\%$ ,  $n=5$  para

-13.7± 2.8, n=5) que não foram diferentes ( $P>0.05$ ) daqueles obtidos com a administração prévia isolada do hexametônio (figura 7).

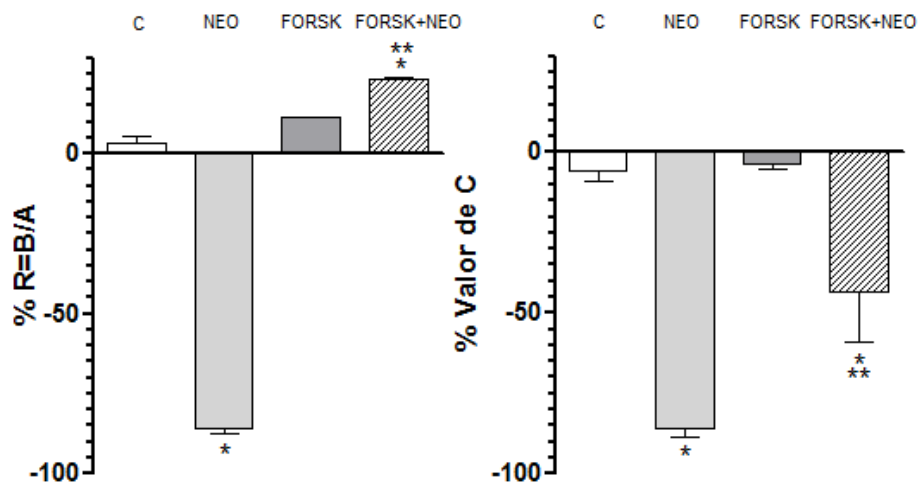
Opostamente aos antagonistas acima analisados, a administração prévia de pirenzepina (10.0 nM) intensificou ( $P<0.05$ ) a fadiga induzida pela neostigmina (de  $-86.0\pm 1.30\%$ , n=6 para  $-93.7\pm 0.78\%$ , n=5) (figura 8). Em contraste, o antagonista dos  $R_{ADA2A}$  (ZM 241385) atenuou ( $p<0.05$ ) a queda nos valores de R (de  $-86.0\pm 1.30\%$ , n=6 para  $-81.7\pm 1.1$ , n=5) (figura 8).



**Figura 8.** Influências do bloqueio dos  $^+R_{M1}$  e  $^+R_{A2A}$  causado pela pirenzepina (PZP, 10 nM, n=5), e ZM 241385 (ZM, 10 nM, n=5) na percentagem (%) de redução nos valores de R e C causados por neostigmina (NEO, 0.50  $\mu$ M, n=6) em preparações nervo frênico-diafragma isolado de ratos indiretamente estimuladas com frequência de 50.0 Hz. Os efeitos causados pelo bloqueio dos  $^+R_{M2}$  por metoctramina (MTC, 0,10  $\mu$ M, n=4) na percentagem de redução nos valores de R e de C causados pela oxotremorina (OXO, 5.0  $\mu$ M, n=4) também são exibidos. Altura das colunas indica média  $\pm$  DP. \* valores diferentes ( $P<0.05$ ) do controle (C; Krebs, n=5) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni) \*\* valores diferentes ( $P<0.05$ ) da NEO separadamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni) e \*\* valores diferentes ( $P<0.05$ ) da OXO separadamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

A fadiga e a redução no valor de C causadas por oxotremorina (5.0  $\mu$ M) foram também atenuadas pela administração prévia de metoctramina (0.10  $\mu$ M) (R de  $-50.8 \pm 1.30\%$ , n=4 para  $-37.2 \pm 2.5$ , n=4; C de  $-63.5 \pm 3.0\%$ , n=4 para  $-43.3 \pm 4.0\%$ , n=4) (figura 8).

O ativador da adenilato-ciclase, forskolin (3.0  $\mu$ M) foi capaz de impedir a fadiga induzida pela neostigmina (de  $-86.0 \pm 1.30\%$ , n=6 para  $+23.2 \pm 0.75\%$ , n=4) e aumenta o valor de R ( $+11.2 \pm 0.25\%$ , n=4) quando administrado separadamente (figura 9). A redução no valor de C causada pela neostigmina foi atenuada por forskolin (de  $-86.1 \pm 2.30\%$ , n=6 para  $-43.5 \pm 15.5\%$ , n=4) (figura 9).



**Figura 9.** Influências da ativação da adenilato-ciclase (AC) causada por forskolin (FORSK, 3.0  $\mu$ M, n=4) na porcentagem (%) de redução nos valores de R e de C causados por neostigmina (NEO, 0.50  $\mu$ M, n=6) nas preparações nervo frênico-diafragma isolado de ratos indiretamente estimuladas com frequência de 50.0 Hz. Altura das colunas indica média  $\pm$  DP. \* valores diferentes ( $P < 0.05$ ) do controle (C; Krebs, n=5) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni) e \*\* valores diferentes ( $P < 0.05$ ) da NEO separadamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

## DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a fadiga tetânica induzida por neostigmina parece ser causada por dois fatores: (I) dessensibilização dos receptores nicotínicos neuronais ( $^+R_{Nn}$ ,  $\alpha3\beta2$ , facilitador) e (II) ativação dos receptores pré-sinápticos muscarínicos  $M_2$  ( $^-R_{M2}$ , inibitórios) do nervo motor. O envolvimento de tais fatores está baseado no fato de que a fadiga induzida pela neostigmina foi atenuada pela prévia administração de um agente inibidor dos  $^+R_{Nn}$  (hexametônio) ou por um antagonista dos  $^-R_{M2}$  (metoctramina), respectivamente. Adicionalmente, quando hexametônio e metoctramina foram administrados conjuntamente, os mesmos foram capazes de impedir completamente a fadiga tetânica induzida por neostigmina, reforçando a participação de tais receptores na fadiga tetânica induzida pela neostigmina (figura 7). Os resultados apresentados também permitem pressupor que a redução da amplitude máxima de contração muscular tetânica (valor de C), causada pela neostigmina, também seja influenciada pela dessensibilização dos  $^+R_{Nn}$  e pela ativação dos  $^-R_{M2}$  presentes no terminal nervoso motor, uma vez que o efeito causado pela neostigmina foi atenuado pela administração prévia de hexametônio ou metoctramina (figura 7).

Diferenças foram registradas no perfil miográfico da contração tetânica de preparações neuromusculares expostas a concentrações idênticas de fasciculín-I ou de neostigmina. Onde, o primeiro agente provocou uma fadiga menos intensa que o segundo (figura 6). O fasciculín-I é um inibidor de alta afinidade, seletivo para a AChE (LE DU et al., 1992). Um estudo realizado por Minic et al. (2003) demonstrou que o fasciculín-I (70nM) foi o único agente anticolinesterásico a inibir, de forma seletiva, 100% da atividade da AChE. Já a concentração de neostigmina usada em nosso estudo induz uma inibição da AChE menor que 94% (MINIC et al., 2003). Portanto, a fadiga menos intensa registrada no presente estudo com o fasciculín-I não resultou do fato de uma menor porcentagem de inibição da AChE quando comparado com a neostigmina. Assim, supõe-se que o perfil da fadiga tetânica do fasciculín-I representaria a configuração de uma fadiga tetânica causada unicamente pelo bloqueio seletivo da AChE, ou seja, quando a fadiga é exclusivamente determinada por acúmulo de moléculas de ACh na fenda sináptica.



Embora a concentração de neostigmina usada no nosso trabalho também seja capaz de inibir a BChE (menos de 21%), foi previamente demonstrado que inibição da BChE tem pouco efeito no perfil da resposta tetânica quando o nervo motor está recebendo estímulos de alta frequência (MINIC et al., 2003). Desta forma, o efeito causado pela administração de neostigmina parece demonstrar como seria a fadiga proporcionada por um agente que apresenta uma ação estimuladora direta sobre os  $R_{Nn}$  ( $\alpha 3\beta 2$ , facilitador) (SADOSHIMA et al., 1988) e uma ação indireta, via acúmulo de ACh na fenda sináptica que, por sua vez, intensificaria a ativação dos receptores muscarínicos inibitórios  $M_2$  (ALVES-DO-PRADO; CORRADO; PRADO, 1987) que já encontravam-se ativados, devido ao estímulo neural de alta frequência.

Adicionalmente, no presente estudo também foi investigado o efeito da ativação seletiva dos  $\bar{R}_{M2}$  por meio da administração de oxotremorina nas preparações neuromusculares estimuladas com pulsos elétricos de 50,0 Hz. O agonista dos  $\bar{R}_{M2}$  foi capaz de induzir fadiga, porém, de menor intensidade quando comparada à fadiga induzida pelos agentes anticolinesterásicos investigados. Uma redução no valor de C foi também observada com a oxotremorina. Tais efeitos inibitórios foram reduzidos pela prévia administração do antagonista seletivo dos  $\bar{R}_{M2}$ , a metoctramina. Estes resultados confirmam resultados prévios (DAS et al., 1978; MICHAELSON et al., 1979) de que ativação de  $\bar{R}_{M2}$  induzem fadiga neuromuscular além de confirmarem a hipótese que o valor de C também é, pelo menos em parte, controlado pela ativação inibitória dos  $\bar{R}_{M2}$  no terminal nervoso motor quando o nervo recebe frequências de estímulos tetanizantes.

Por outro lado, Oliveira et al. (2002) demonstraram que a ativação dos  $^+R_{M1}$  (facilitatório) presentes no terminal nervoso motor é capaz de reduzir a atividade inibitória dos  $\bar{R}_{M2}$  (através da proteína quinase C), quando uma frequência de 50,0 Hz é aplicada no nervo motor. Os mesmos autores também verificaram que a atividade dos  $^+R_{M1}$  pode ser reduzida quando os  $^+R_{ADA2A}$  estão sendo plenamente ativados pela adenosina liberada do nervo e da musculatura esquelética (figura 2). Nesse sentido, uma vez que nossos resultados mostraram que o prévio bloqueio dos  $^+R_{M1}$  por pirenzepina intensificou a fadiga causada por neostigmina, é possível supor que a atividade desses receptores poderia estar reduzindo o efeito inibitório na liberação de ACh, mediado pelos  $\bar{R}_{M2}$ , quando as preparações tratadas com

neostigmina foram indiretamente estimuladas a 50,0 Hz. Tal efeito inibitório estaria sendo impedido quando os  ${}^+R_{M1}$  foram bloqueados pela pirenzepina. A atividade inibitória de  ${}^+R_{ADA2A}$  sobre os  ${}^+R_{M1}$  foi também observada no presente estudo e, em concordância com Oliveira et al. (2002), a prévia administração do antagonista seletivo de  $R_{ADA2A}$  (ZM 241385) foi capaz de atenuar a fadiga induzida por neostigmina.

Foi observado que a ativação dos  $\bar{R}_{M2}$  reduz a atividade da adenilato-ciclase (AC) por meio da proteína  $G_i$ ; assim, o baixo nível de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) no terminal nervoso motor, levaria a uma redução da liberação de ACh (BROWN e LAIKEN 2012; MICHAL et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006). Por outro lado, a ativação da adenilato-ciclase (AC) pode também aumentar a atividade da proteína quinase A (PKA) (DESSAUER et al., 2017; ANGELANTONIO et al., 2011; SANTAFÉ et al., 2006). Esta última via desempenha um importante papel quando os receptores pré-sinápticos  $R_{ADA2A}$  (acoplados à proteína  $G_s$ ) são ativados pela adenosina (CORREA-DE-SÁ; RIBEIRO 1994). Por meio da técnica de *patch clamp*, foi demonstrado que a ativação tônica dos  $R_{ADA2A}$  é capaz de acelerar o recobro da dessensibilização dos  $R_{Nn}$  em cultura de células renais de embrião humano (REH). Tal modulação dos  $R_{Nn}$  por meio dos  $R_{ADA2A}$  parece ser determinada por vias envolvendo a PKA (ANGELANTONIO et al., 2011).

Nesse contexto, é possível supor que o completo impedimento da fadiga induzida por neostigmina, obtido com a administração prévia do ativador da AC (forskolin) resultaria tanto da saída mais rápida dos  $R_{Nn}$  ( $\alpha3\beta2$ , facilitador) do seu estado dessensibilizado (via PKA), bem como pela redução do efeito inibidor sobre a adenilato-ciclase induzido pelos receptores pré-sinápticos  $\bar{R}_{M2}$  (ativados devido ao acúmulo de ACh na fenda sináptica), uma vez que o forskolin é um ativador da AC.

Controversamente, foi proposto que o forskolin poderia causar dessensibilização de receptores nicotínicos (GANDÍA et al., 1997; AYLWIN e WHITE 1992). No entanto, nos nossos estudos, é improvável que o forskolin tenha causado tal dessensibilização nos receptores  $R_{Nn}$  ( $\alpha3\beta2$ ), pois, nessas circunstâncias, um agravamento da fadiga seria esperado e não um impedimento da fadiga, como foi por nós observado.

É também improvável que os efeitos registrados após a administração de neostigmina tenham sido gerados por uma ação pós-sináptica do mesmo, devido ao acúmulo do fármaco e/ou de ACh na fenda sináptica, uma vez que os efeitos causados pela neostigmina foram reduzidos pela prévia administração isolada de hexametônio ou metoctramina e um total impedimento da fadiga, ou mesmo, uma melhora dos valores de R foram registrados com a administração conjunta de hexametônio e metoctramina previamente à neostigmina. Uma vez que as concentrações de pirenzepina, metoctramina, ZM 241385 e oxotremorina utilizadas no presente estudo foram aquelas reconhecidas como seletivas, respectivamente, para  $^+R_{M1}$ ,  $^-R_{M2}$  e  $R_{ADA2A}$  do terminal nervoso motor. E ainda, tendo em conta que a concentração de hexametônio utilizada no presente estudo foi anteriormente pesquisada como capaz de modificar a fadiga causada pela neostigmina sem, contudo, induzir qualquer redução na amplitude da contração tetânica quando administrada isoladamente. É improvável que a fadiga induzida por neostigmina tenha sido causada por possíveis ações pós-sinápticas.

## CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os dados sugerem que o forskolin, bem como a administração combinada de hexametônio e um bloqueador de receptores muscarínicos podem ser clinicamente úteis para proteger a transmissão neuromuscular da fadiga neuromuscular induzida por neostigmina.

Uma vez que a popularidade dos suplementos dietéticos para o controle de peso aumentou drasticamente nos últimos anos e, levando em conta, que o forskolin é um dos vários produtos disponíveis para essa utilização (RÍOS-HOYO; GUTIÉRREZ-SALMEÁN, 2016), o presente estudo também indica que é necessário cautela para o uso de neostigmina em pacientes que estão usando forskolin como suplementos dietéticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-DO-PRADO, W. **Farmacologia das Neurotransmissões Colinérgicas Periféricas**. Maringá: EDUEM, p.50. 2011.

ALVES-DO-PRADO, W; CORRADO, A; PRADO, W.A. Reversal by atropine of tetanic fade induced in cats by antinicotinic and anticholinesterase agents. **Anesthesia and Analgesia Journals**, v.66, p.492-496, 1987.

AYLWIN, M.L; WHITE, M.M; Forskolin acts as a noncompetitive inhibitor of nicotinic acetylcholine receptors. **Molecular Pharmacology**,v.41, n.5, p.908-913, 1992.

ANGELATONIO, S.D; PICCIONI, A; MORICONI, C; TRETTEL, F; CRISTALLI, G; FRANCESCA, G; LIMATOLA,C. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor induces protein kinase A-dependent functional modulation of human  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic receptor. **The Journal of Physiology**, v.589, n.11, p.2755-2766, 2011.

BORNIA, C.E; CORREA-DE-SÁ, P; ALVES-DO-PRADO, W. Presynaptic facilitatory adenosine A<sub>2A</sub> receptors mediate fade induced by neuromuscular relaxants that exhibit anticholinesterase activity. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.38, p.164-169, 2011.

BOWMAN, W.C.; PRIOR, C.; MARSHALL, I. G. Presynaptic receptor in the neuromuscular junction. **Annual New York Academy of Science**, v. 604, p.69-81, 1990.

BRITO, L.R.G. Transmissão sináptica e integração neural. In: CURI, R; PROCÓPIO, J. **Fisiologia Básica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.128, 2009.

BROWN J.H; LAIKEN. N. Agonistas e antagonistas dos receptores muscarínicos. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12<sup>a</sup> edição, Porto Alegre:AMGH, p. 219-235, 2012.

COLQUHON D; MATHIE A., MULRINE N. K., OGDEN, D. C. Studies on single acetylcholine-receptor channel in muscle endplate and sympathetic neurons. In: SELLIN L.C.; LIBELIUS, R.; THESLEFF, S. **Neuromuscular junction**, Amsterdam: Elsevier, p.217-234, 1989.

CORREIA-DE-SÁ P; RIBEIRO, J.A. Evidence that the presynaptic A<sub>2A</sub>-adenosine receptor of the rat motor nerve endings is positively coupled to adenylate cyclase. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v.350, p.514-522, 1994.

CORREIA-DE-SÁ P; TIMÓTEO M. A., RIBEIRO J. A. Presynaptic A<sub>1</sub> inhibitory/A<sub>2A</sub> facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. **Journal of Neurophysiology**, v.76, p.3910-3919, 1996.

DAS, M; GANGULY, D.K; VEDASIROMONI, J.R. Enhancement by oxotremorine of acetylcholine release from the rat phrenic nerve. **British Journal of Pharmacology**, v.62, n.2, p.195-198, 1978.

DESSAUER, C.W; WATTS, V.J; OSTROM, R.S; CONTI, M; DOVE, S; SEIFERT, R. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CI. Structures and Small Molecule Modulators of Mammalian Adenylyl Cyclases. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.69, p.93-139, 2017.

FARIA M., OLIVEIRA L., TIMÓTEO M. A., LOBO M. G., CORREIA-DE-SÁ, P. Blockade of neuronal facilitatory nicotinic receptors containing alpha3 beta2 subunits contribute to tetanic fade in the rat isolated diaphragm. **Synapse**, v. 49, n. 2, p.77–88, 2003.

FERGUSON, S. M.; BLAKELY, R. D. The choline transporter resurfaces: new roles for synaptic vesicles? **Molecular Interventions**, v.4, n.1, p.22-37, 2004.

GANDÍA, L; VITALE, M.L; VILARROYA, M; RAMIREZ-LAVERGNE, C; GARCIA, A.G. Differential effects of forskolin and 1,9-dideoxy-forskolin on nicotinic receptor- and K<sup>+</sup>-induced responses in chromaffin cells. **European Journal of Pharmacology**, v.328, p.189-199, 1997.

HIBBS, R.E.; ZAMBON, A.C. Fármacos que atuam na junção neuromuscular e nos gânglios autonômicos. In: Brunton, L.L.; Chabner, B.A.; Knollmann, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12<sup>a</sup> edição, Porto Alegre: AMGH, p.255-275, 2012.

KANDEL, E.R; SCHWARTZ, J.H; JESSELL.T.M; SIEGELBAUM, S.A; HUDSPETH, A.J. Princípios de neurociências. 5 ° ed. Porto Alegre: Artmed, p.168, 2014.

KOEPPEN, B.M; STANTON, B.A. **Berne e Levy: Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, p.81, 2009.

KUHAR, M.J.; MURRIN, L.C. Sodium-dependent, high-affinity choline uptake. **Journal of Neurochemistry**, v. 30, p.15-21, 1978.

LE DU, M.H; MARCHOT, P; BOURGIS, P.E; FONTECILLA-CAMPS. A resolution structure os fasciculin 1, an anti-acetilcholinesterase toxin from green mamba snake venom. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.31, p.22122-30, 1992.

MATOS SILVA, L.F.C; DE PAULA RAMOS, E.R; AMBIEL, C.R; CORREA-DE-SÁ, P; ALVES-DO-PRADO, W. Apamin reduces neuromuscular transmission by activating inhibitory muscarinic M2 receptors on motor nerve terminals. **European Journal of Pharmacology**, v.626, p.239-243, 2010.

MICHAL. P; EL-FAKAHANY, E.E; DOLEZAL. V. Muscarinic M2 Receptors Directly Activate Gq/11 and Gs G-Proteins. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.320, n.2, p.607-614, 2007.

MICHAELSON, D.M; AVISSAR, S; KLOOG, Y; SOKOLOVSKY,M. Mechanism of acetylcholine release: Possible involvement of presynaptic muscarinic receptors in regulation of acetylcholine release and protein phosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.76, n.12, p.6336-6340, 1979.

MINIC, J; CHATONNET, A; KREJCI ,E ; MOLGÓ, J. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions. **British Journal of Pharmacology**, v.138, p.177-187, 2003.

OLIVEIRA, L.J.F. **Regulação da atividade dos receptores muscarínicos neuronais pela adenosina na placa motora de rato: Papel das cinases A e C e dos canais Ca<sub>v</sub>1 (tipo L)**. Tese (Doutorado Ciências Biomédicas) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto, Porto, p.40, 2006.

OLIVEIRA L, COSTA AC, NORONHA-MATOS JB, SILVA I, CAVALCANTE WL, TIMÓTEO MA, CORRADO AP, DAL BELO CA, AMBIEL CR, ALVES-DO-PRADO W, CORREIA-DE-SÁ P. Amplification of neuromuscular transmission by methylprednisolone involves activation of presynaptic facilitatory adenosine A<sub>2A</sub> receptors and redistribution of synaptic vesicles. **Neuropharmacology**, v. 89, p.64-76, 2015.

OLIVEIRA, L.; TIMÓTEO, M. A.; CORREIA-DE-SÁ, P. Modulation by adenosine of both muscarinic M<sub>1</sub>-facilitation and M<sub>2</sub>-inhibition of [<sup>3</sup>H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, p.1728-1736, 2002.

OLIVEIRA, L., CORREIA-DE-SÁ, P. Protein kinase A and Cav1 (L-Type) channels are common targets to facilitatory adenosine A<sub>2A</sub> and muscarinic M<sub>1</sub> receptors on rat motoneurons. **Neurosignals**, v.14, p.262-272, 2005.

PURVES, D; AUGUSTINE, G.J; FITZPATRICK, D; HALL,W.C; LaMANTIA, A; McNAMARA, J.O; WHITE, L.E. **Neurociências**. 4 ed, Porto Alegre: Artmed, p.397-402, 2007.

RÍOS-HOYO, A., GUTIÉRREZ-SALMEÁN, G. New dietary supplements for obesity: what we currently know. **Current Obesity Reports**, v.5,p.262-270, 2016.

SADOSHIMA, J; TOKUTOMI, N; AKAIKE. N. Effects of neostigmine and physostigmine on the acetylcholine receptor-ionophore complex in frog isolated sympathetic neurons. **British Journal of Pharmacology**, v.94, p.620-624, 1988.

SANTAFÉ, M.M; LANUZA, M.A; GARCIA, N; TOMA`S, J. Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. **European Journal of Neuroscience**, v.23, p.2048-2056, 2006.

SHERBY, S.M., ELDEFRAWI, A.T., ALBUQUERQUE, E.X., ELDEFRAWI, M.E., 1985. Comparison of the actions of carbamate anticholinesterases on the nicotinic acetylcholine receptor. **Molecular Pharmacology**, v.27, p. 343-348, 1985.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. **Nature Reviews of Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

TAYLOR P. Agentes Anticolinesterásicos. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12ª edição, Porto Alegre:AMGH, p. 239-254, 2012.

WESSLER, I. Control of transmitter release from the motor nerve by presynaptic nicotinic and muscarinic autoreceptors. **Trends of Pharmacology Sciences**, v. 10, p. 110-114, 1989.

WESSLER, I., HALANK, M., RASBACH, J., KILBINGER, H. Presynaptic nicotine receptors mediating a positive feedback on transmitter release from the rat phrenic nerve. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 334, p.365-372, 1986.