MÁRIO OSHIMA

EFEITOS FARMACOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DO POLIETILENOGLICOL (PEG 400) EM PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES

CAMPINAS

Unicamp

2008

MÁRIO OSHIMA

EFEITOS FARMACOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DO POLIETILENOGLICOL (PEG 400) EM PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES

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

ORIENTAÇÃO: PROFA. DRA. LÉA RODRIGUES SIMIONI

CO-ORIENTAÇÃO: PROFA. DRA. YOKO OSHIMA FRANCO

CAMPINAS

Unicamp

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Oshima, Mário
Os26e Efeito farmacológicos e morfológicos do polietilenoglicol (PEG400) em preparações neuromusculares / Mário Oshima. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

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

1. Polietileno glicol. 2. Solventes. 3. Junção neuromuscular. I. Simioni, Léa Rodrigues. II. Franco, Yoko Oshima. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : The influence of polyethylene glycol 400 (PEG) on the neuromuscular junction

Keywords: • Polyethylene glycol
• Solvent
• Neuromuscular junction

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni
Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga
Prof. Dr. Chárist on Dal Belo

Data da defesa: 30-01-2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Mário Oshima

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Léa Rodrigues Simioni

Membros:
Professor (a) Doutor (a) **Cháristo n André Dal Belo**
Professor (a) Doutor (a) **Angelica De Fatima de Assuncao Braga**

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/01/2009

DEDICO...

Aos meus irmãos Akiyoshi Oshima e Yoko Oshima Franco,

que me fizeram acreditar na possibilidade de que não era tarde demais.... e a Yoko, que me ofereceu um caminho e se tornou minha co-orientadora.

à Dra. Lea Rodrigues Simioni, que abriu as portas da Unicamp.

A Deus que colocou todas as pessoas certas neste caminho...

A todas estas pessoas certas que estiveram ao meu lado torcendo, ajudando e motivando...

Me ajudaram, assim, a construir parte muito importante da minha história...

Obrigado ao meu universo de mundo, família e amigos que ajudam para que minha vida seja linda e maravilhosa para ser vivida e é através desse amor que tento buscar um pouco mais de conhecimento e evolução.

AGRADECIMENTOS

A Deus...com seu amor infinito, cuida de todos nós e me possibilita evoluir..

aos meus Pais...referência e luz para minha felicidade...

aos meus irmãos...que me protegem.. verdadeiros amigos....

à minha família tão grande...em quantidade e qualidade...

à Caroline e Marcela...filhas que não educo...namoro...quanto amor...

à Maria Claudia Garavati Oshima....meu anjo, mulher da minha vida....

aos meus funcionários...sempre me apoiando e elevando minha imagem...

aos meus pacientes...que tiveram paciência e compreensão....

ao Luiz Massa Shimura....compreensão, apoio, amizade e companheirismo...

aos meus amigos do futebol e do surf ....que me afastei, mas volto...."é nóis"...

à USP (Graduação) e à Unicamp (Mestrado)...geradores de oportunidades...

à Profa. Dra. Lea Rodrigues Simioni...bela visão da ciência, sabedoria e liderança...

à Profa. Dra. Yoko Oshima Franco...que energia, dedicação e amor...

ao Prof. Dr. Oswaldo Vital Brasil (in memorian)....orgulhoso por te conhecer...

aos Professores da banca de qualificação...Prof. Dr. Edson Antunes, Professora Dra.Angélica de Fátima Assunção Braga e Professora Dra. Albetiza L. Araujo

à Professora Maria Alice da Cruz Höfling...acesso ao IB e atenção carinhosa...

ao Prof. Stephen Hyslop...belo conhecimento...

ao Prof. Dr. Alexandre Corrado...sempre querendo ensinar algo a mais...

à Profa. Julia Prado Franceschi...sua aula é uma história gostosa de assistir...

ao Prof. Dr. Nadin F. Heluany...em meia hora me ajudou com alegria...

ao Chariston André Dal Belo...quantos requisitos aprimorados...

à Saraguaci Hernandes Oliveira Silva...astral e carinho pra todos...

ao Valdemir de Abreu...tudo de professor e que simpatia...

à Priscila Randazzo...alguém que realmente gosta de estudar....que valor....

à Lilian Gobbo de Freitas Bueno...me recebeu com muita delicadeza...

à Caroline Ribeiro de Borja...que meiguice de pessoa...

à Georgina Sucasaca Monzon....uma pessoa doce e bondosa...

à Charlene Galbiatti...seu sorriso fala mais alto e diz muito...

à Delkia Moraes...que "chegou chegando"parecendo uma amiga antiga...

à Mariana Cintra Francischinelli....produtividade de quem sabe o que quer....

ao Aracélio Viana Colares...que bons momentos na sua companhia....

à Lourdes, Thomaz, Mariana, Adriana, Delano, Luiz...convivência alegre e descontraída...

à Thalita, Catarina, Karina....como me receberam bem na Histologia...

à Marta Leonardo...ensina, ajuda e confia nos alunos de outros departamentos...

à Elaine , Fran e Wanderlei....simpatia, competência e sempre dizendo sim...

ao Miguel, Marcos, Toninho, Zé Ilton, Agnaldo, Adilson...sempre prestativos...

à Cleide do serviço de Estatística...quanta paciência comigo...

à Mercedes do apoio didático...que capricho e amor com os alunos...

aos animais....à cada experimento melhorando minha ética...

ao Thiago Magalhães Camargo...chegou para ser companheiro e cativar amizade...

ao Dimas dos Santos Rocha Jr...verdadeiro e que facilidade se divertir ao seu lado...

ao Sandro Rostelato...amigo, companheiro....inesquecível...e que potencial....

ao Gildo Bernardo Leite...simplesmente fundamental....e que ser humano....

As duas maiores forças... o AMOR e DEUS...

Se não for humilde pela essência, que seja pela postura...

Fidelidade e lealdade também é postural...

Desta vida levamos os sentimentos, a moral e o conhecimento...

Conhecimento é sinônimo de responsabilidade...

Única opção pra se viver é ser feliz... e é opção....

Todos temos os mesmos sentimentos e mesmos problemas... portanto, somos iguais...

Poucas chances pra quem se envolve com vícios e crimes...

Difícil lidar com as três maiores cobiças: sexo, poder e dinheiro...

Reflito o egoísmo... talvez o pior sentimento humano e destruidor de tudo...

É mais fácil viver acreditando em eternidade...

Tudo que passamos....ou merecemos ou precisamos...e o motivo é evolução...

Diante do difícil... use a inteligência e a bondade...

A dúvida é científica... e na dúvida não decida...e quem tem dúvidas decide melhor....

Pais... entidade sagrada....

Evoluir como ser humano, cidadão, profissional... para isso serve o estudo...

Perseverar é o caminho da certeza....e da realização....

Pratique com emoção e prazer os cinco sentidos...

Lembre-se várias vezes ao dia as dez melhores coisas da sua vida....

Desenvolva sempre...des-envolva...e olhe com outra visão...

O maior patrimônio material... o nosso corpo físico...e o maior valor...a saúde.

(autor desconhecido).

O polietilenoglicol (PEG) tem sido amplamente utilizado em diversos setores, entre eles, o cosmético, odontológico, farmacêutico (até como carreador de fármacos a órgãos-alvo), em virtude de suas fantásticas propriedades químicas. Por tal razão, é denominada uma molécula bioativa e teve o seu consumo interno aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA).

O objetivo deste trabalho foi pesquisar os efeitos farmacológicos do PEG 400 sobre a junção neuromuscular; a partir de observações experimentais em preparações de camundongo e pintainho.

Concentrações de 3 µM, 20 µM e 100 µM de PEG 400, d-Tc (6 µM), neostigmina (12 µM) e dantrolene (30 µM) auxiliaram na busca do entendimento do mecanismo do PEG sobre a junção neuromuscular. Foram utilizadas em técnicas miográfica, eletrofisiológica e análise morfológica, nas preparações nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongos e biventer cervicis (BC) de pintainhos. Especificamente, foi investigada a ação do PEG 400 sobre o terminal nervoso, fenda sináptica, receptores nicotínicos ou fibra muscular.

Os resultados obtidos através da técnica eltrofisiológica mostraram que o PEG 400 não exibe ação pré-sináptica, pois não interfere no valor do CQ e nem mesmo apresenta ação anticolinesterásica quando comparado à neostigmina como controle positivo; também não mostrou qualquer efeito em receptores nicotínicos, mas alterou a polaridade do sarcolema causando despolarização das fibras musculares (-80 mV para -16 ± 1,7 mV) para o PEG 400 (100 µM). Além disso, o PEG 400 (20 µM) em BC, exibiu antagonismo ao dantrolene (inibidor de receptor de rianodina) e impediu seu efeito sobre a contração muscular através do Cálcio. Finalmente, o PEG 400 não causa mionecrose (3 µM e 20 µM), nem mesmo em concentrações maiores (100 µM), nas quais causa bloqueio total das respostas do músculo BC.

ABSTRACT

Polyethyleneglycol has been widely used in several areas such as cosmetic, odontology and pharmaceutical (even as drugs carrier) due to its chemical properties. Thus, it is considered a bioactive molecule being its internal consumption approved by the Food and Drug Administration (FDA). The aim of this study was to analyze the pharmacological effects of PEG 400 over the neuromuscular junction through experimental observations in mice preparations due to the increase of the contractile response amplitude (facilitating effect).

Conventional myographic techniques, morphological and electrophysiological analysis were used in mice, phrenic nerve diaphragm preparations (PND) and chick, biventer cervicis preparations (BC). Concentrations of 3 μM, 20 μM and 100 μM of PEG 400, d-Tc 6 μM, neostigmine 12 μM and dantrolene 30 μM helped in the search for the understanding of PEG mechanism. Specifically, the action of PEG 400 was investigated over the nervous terminal, the synaptic cleft, nicotinic receptors or muscle fiber.

The results obtained through the electrophysiological technique showed that PEG 400 did not exhibit pre-synaptic action and did not act as an anticholinesterasic, as well as neostigmine. It has not presented action over nicotinic receptors but it presented post-synaptic action, interfering on the sarcolemma polarity and reverting the action of the Calcium antagonist, dantrolene, suggesting an interference of the contraction mechanism through Calcium and the ryanodine receptor. Finally, PEG 400 did not cause mionecrosis (3 μM and 20 μM) even in concentrations high enough to cause total muscle blockade (100 μM).

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma (s)
µL	Microlitro (s)
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
BC	biventer cervicis
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CO_2	Gás carbônico
CQ	Conteúdo quântico
d-Tc	d-Tubocurarina
FDA	Food and Drug Administration
Hz	Hertz
KCl	Cloreto de potássio
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro (s)
mM	milimolar
µM	micromolar
ms	Milisegundo (s)
NaCl	Cloreto de sódio
NaH_2PO_4	Fosfato de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NFD	Nervo Frênico Diafragma

O_2	Oxigênio
PE	Potencial de equilíbrio
PEG	Polietilenoglicol
PEO	Polioxidoetileno
PM	Potencial de membrana
PPT	Potencial de placa terminal
PPT’	Potencial de placa terminal corrigido
V	Volts
w	Lavagem

LISTA DE FIGURAS

		PÁG.
Figura 1-	Gráfico representativo da curva concentração-resposta do PEG 400 em preparações neuromusculares de ave e de mamífero.....	30
Figura 2-	Conteúdo Quântico (CQ) em preparação NFD de camundongo, técnica do músculo cortado.....	32
Figura 3-	Experimentos em preparações curarizadas (6 μM) músculo biventer cervicis de pintainhos, estímulo indireto.....	33
Figura 4-	Respostas contraturantes à adição exógena de ACh e KCl em preparações BC tratadas com PEG 400.....	34
Figura 5-	Registro miográfico representativo da preparação BC de pintainho sob estimulação elétrica direta.....	36
Figura 6-	Medidas do potencial de membrana no músculo diafragma de camundongo (NFD).....	38
Figura 7-	Preparações biventer cervicis tratadas com dantrolene, seguidas da adição de PEG 400.....	39
Figura 8-	Figuras representativas de miografias na preparação BC de pintainho, sob estimulação elétrica direta (20 V, 2ms).....	40
Figura 9-	Registro miográfico representativo de protocolos experimentais em preparações NFD.....	41
Figura 10-	Figura representativa de cortes do músculo biventer cervicis de pintainho exposto à solução Krebs.....	42

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO.....	*ix*
ABSTRACT.....	*x*
1- INTRODUÇÃO.....	16
2- OBJETIVOS.....	19
2.1- Objetivo geral.....	20
2.2- Objetivos específicos.....	20
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1- Animais.....	22
3.2- Materiais.....	22
3.3- Soluções nutritivas.....	22
3.4- Ensaios biológicos.....	23
3.4.1- Preparação nervo frênico diafragma (NFD) de camundongo.....	23
3.4.2- Preparação biventer cervicis de pintainho.....	23
3.5- Técnica histológica (microscopia óptica).....	24
3.6- Técnica eletrofisiológica.....	25
3.7- Registro do potencial de membrana (PM).....	26
3.8- Análise do conteúdo quântico (CQ).....	26
3.9- Análise estatística.....	27
4- RESULTADOS.....	28
4.1- Curva concentração-resposta do PEG 400.....	29
4.2- Atividade do PEG 400 avaliada através da técnica eletrofisiológica..	31
4.3- Protocolo para avaliação de ação anticolinesterásica do PEG 400....	33

4.4- Resposta à adição exógena de ACh e KCl..... 34

4.5- Preparação biventer cervicis de pintainho (estimulo direto)..... 35

4.6- Potencial de membrana em repouso..... 37

4.7- Protocolo com dantrolene..... 39

4.8- PEG 400 a 100 µM em preparação BC..... 40

4.9- PEG 400 a 100 µM em preparação NFD..... 41

4.10- Análise morfológica do músculo biventer cervicis de pintainho..... 42

5- DISCUSSÃO..... 43

5.1- Técnica miográfica..... 44

5.2- Técnica eletrofisiológica (análise do Conteúdo quântico)..... 45

5.3- Estudo do PEG 400 comparado com os efeitos da Neostigmina..... 46

5.4- Estudo pós-sináptico..... 46

5.4.1- Resposta contraturante à adição exógena de ACh e KCl..... 46

5.5- Estímulo direto em pintainhos (músculo biventer cervicis)..... 47

5.6- Registro do potencial de membrana..... 47

5.7- Protocolo experimental com dantrolene..... 48

5.8- Bloqueio total (pintainhos e camundongos sob estímulo elétrico direto)..... 48

5.9- Análise morfológica..... 49

6- CONCLUSÃO..... 50

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 52

8- ANEXOS..... 57

Anexo 1- Comissão de Ética na experimentação animal..... 58

Anexo 2- Comprovante de envio de paper a Muscle & Nerve..... 59

Anexo 3- Artigo encaminhado à Revista Muscle & Nerve..... 60

1- INTRODUÇÃO

O polietilenoglicol é um composto de grande importância para as áreas biomédicas e de biomateriais (Li, 2001). É produzido mundialmente em grandes quantidades e com massas molares variando de poucas centenas a milhares de dáltons. A designação PEG (Polietilenoglicol) é usada para compostos de baixa massa molar (abaixo 20.000 g/mol) e a designação PEO, poli (óxido de etileno), é restrita a compostos de altas massas molares (maiores que 20.000 g/mol) (Ribeiro, 2001).

Os PEGs com massas molares menores que 1.000 g/mol são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas. Os de massas molares elevadas, acima de 1.000 g/mol, são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. Podem ser estocados à temperatura ambiente, embora a 4ºC a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada (Ribeiro, 2001).

A utilização de PEG é de grande interesse na biotecnologia principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com esses agentes. Por serem compostos biodegradáveis e atóxicos, a descarga de PEG não é problemática para o meio ambiente. O PEG possui uma variedade de propriedades pertinentes para aplicações biomédicas, sendo elas: insolubilidade em água a elevadas temperaturas, formação de complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água, agente precipitante de proteínas e ácidos nucléicos. Tais propriedades conferem ampla utilização (agente emulsificante, umectante, lubrificante, plastificante e detergente) em diversos setores (alimentício, farmacêutico, médico, odontológico, cosmético, têxtil, industrial, entre outros). Vale ressaltar que o PEG foi aprovado para consumo interno pelo FDA (Food and Drug Administration) (Li, 2001).

Os estudos com PEG sobre a junção neuromuscular seguiram os passos do dimetil sulfóxido (DMSO), com a pesquisa de Evans e Jaggard (1973), que referiu a este (DMSO) uma propriedade fusogênica, posteriormente estudado sobre a transmissão neuromuscular (McLarnon et al., 1986).

A propriedade fusogênica do PEG em outros tipos celulares tem sido relatada há várias décadas. Maggio et al. (1976) observaram que o PEG, glicerol e DMSO diminuíam notavelmente os potenciais da superfície de monocamadas de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, além dos seus envolvimentos na fusão celular.

Os efeitos destas substâncias continuaram a ser investigados sobre o aspecto da fusão celular em membranas isoladas também de retículos sarcoplasmáticos (Stromer et al., 1976); células somáticas (Norwood et al., 1976); células CHO (linhagem celular de mamífero, Chinese Hamster Origin) (Lau et al., 1977); pesquisou-se a influência da água e íons cálcio na fusão celular induzida pelo PEG (Blow et al., 1978); em eritrócitos de galinhas (Smith et al., 1982); em pequenas vesículas unilamelares de fosfatidilcolina de ovo (Boni et al., 1984); em eritrócitos de peru e humanos (Huang e Hui, 1986; 1990); em vesículas unilamelares expulsas (Massenburg e Lentz, 1993).

Geron e Meiri (1985) estudaram a fusão de vesículas sinápticas com a superfície da membrana do terminal nervoso, que é um passo na transmissão sináptica e que normalmente requer o influxo de íons cálcio no terminal. Os autores verificaram que a fusão (e a subseqüente liberação do neurotransmissor) pode também ser induzida pelas substâncias fusogênicas DMSO e PEG. Concluíram que íons cálcio e DMSO exibiam um efeito sinérgico na fusão de vesículas sinápticas com o axolema, de forma semelhante ao fenômeno da fusão com lipossomos.

O fenômeno da fusão passou, então, a ser estudado em lipossomos (Mishra et al., 1988; Holland et al., 1996; Basanez et al., 1997); em seus aspectos morfológicos nos axônios mielinizados (Krause e Bittner, 1990); com substâncias inibidoras da fusão (Baldwin et al., 1992); nos aspectos bioquímicos (Haque et al., 2001a,b; Haque e Lentz, 2002); e nos aspectos genéticos (Kishi et al., 2003).

O PEG 400 que foi utilizado neste estudo possui massa molecular entre 380 a 420 g/mol e para efeitos de cálculos de concentração foi fixado o peso molecular em 400 g/mol. Sua fórmula química $H(OCH_2CH_2)_nOH$, onde n determina o peso molecular, é solúvel em água, higroscópico e estável em condições ordinárias. O PEG é uma substância com muitos sinônimos: Macrogol, Polyoxiethylene, Aquaffin, Nycoline, alpha-hidro-omega-hidroxipoly (oxy-1,2-ethanedyl), polyethylene glycol, Poly Ethylene Oxide, Polyoxyethylene, Poly (ethylene glycol).

Nota-se, portanto, que o PEG, embora extensivamente estudado em vários tipos celulares tem apresentado poucos estudos no âmbito da junção neuromuscular, é utilizado na formulação de vários medicamentos, presente em vários setores de atividade, fatores estes, que determinaram a exploração desse agente no presente estudo.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi pesquisar os efeitos farmacológicos do PEG 400 sobre a junção neuromuscular, utilizando diferentes preparações neuromusculares (camundongo e ave).

2.2- Objetivos específicos

1) Estudo do PEG 400 sob análise do Conteúdo quântico (CQ).
2) Estudo do PEG 400 comparado com os efeitos da Neostigmina.
3) Estudo do PEG 400 comparado com efeitos do Dantrolene.
4) Estudo dos efeitos bloqueadores do PEG 400.
5) Estudo do PEG 400 sob análise morfológica.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 25 e 30 g, fornecidos pela Central de Bioterismo (Unicamp) e pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40 e 50 g (4 a 8 dias), fornecidos pela Granja Globo Aves. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia (Unicamp) em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz).

O projeto foi submetido e aprovado sob o protocolo nº 973-1 (Anexo 1) pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (CEEA-IB-Unicamp) em reunião realizada em 22 de março de 2006.

3.2- Materiais

Polietilenoglicol 400 (PEG 400) foi obtido do laboratório Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (Diadema-SP). Drogas como d-Tubocurarina (d-Tc) da Abbott Laboratories (São Paulo, Brasil), acetilcolina (ACh), Cloreto de potássio (KCl), neostigmina (laboratório Roche, São Paulo, Brasil) e dantrolene da Sigma- Aldrich Co (St. Louis, MO, USA), foram utilizadas como ferramentas farmacológicas.

3.3- Soluções nutritivas

Para camundongos - Solução de Tyrode (mM): NaCl 137; KCl 2,7; $CaCl_2$ 1,8; $MgCl_2$ 0,49; NaH_2PO_4 0,42; $NaHCO_3$ 11,9 e glicose 11,1.

Para pintainhos - Solução de Krebs (mM): NaCl 118,1, KCl 4,8, $CaCl_2$ 2,5, $MgSO_4$ 1,2, $NaHCO_3$ 25 e glicose 11,1.

3.4- Ensaios biológicos

3.4.1- Preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo

Camundongos foram sacrificados pela secção e sangria dos vasos cervicais, após anestesia com halotano (via inalatória). A preparação foi retirada, segundo técnica descrita por Bülbring (1946), colocada em cuba contendo solução de Tyrode presa aos músculos intercostais por ganchos existentes na base da cuba. A temperatura foi mantida a 37ºC e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O_2 e 5% CO_2). O registro da força de contração muscular foi obtido por meio de transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM, acoplado a um fisiógrafo Gould Universal Amplifier Model RS 3400. O músculo foi submetido à tensão constante de 5 g/cm e à estimulação indireta (nervo frênico) gerado por estimulador S48F (Grass Instruments), 3 V, 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de freqüência. Para a estimulação direta, a voltagem foi de 50 V e 2 ms de duração. As contrações musculares foram registradas em um fisiógrafo (Gould RS 3400), por meio de um transdutor isométrico (Load Cell BG-10 GM). O PEG 400 em diferentes concentrações foi aplicado à preparação para obtenção da curva dose-resposta (3 μM, 20 μM e 100 μM) e observadas durante 60 min. A ação muscular direta foi ensaiada tratando a preparação com d-Tubocurarina (6 μM), seguida de estimulação direta.

3.4.2- Preparação biventer cervicis de pintainho

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados com halotano (via inalatória), após o isolamento, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 mL, contendo solução nutritiva de Krebs. A solução foi areada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O_2 e 5% CO_2) e mantida a 37°C. A preparação foi submetida à tensão constante de 1 g/cm e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo).

Foram aplicados pulsos supramaximais de 5 V, 0,1 Hz de freqüência e 0,2 ms de duração (estimulador Grass S48) para estimulação indireta e 20 V, 2 ms de duração, 0,1 Hz, para estimulação direta. As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos

maximais e as contraturas em resposta às adições exógenas de KCl (13,4 mM) e ACh (110 μM) foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM. O registro das contraturas para o potássio e para a acetilcolina foram realizados com ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição da droga) e no final do experimento (após 60 minutos de incubação com o PEG 400 ou após bloqueio total). Para o registro das respostas à estimulação direta (20 V), foi utilizada d-Tubocurarina na concentração de 6 μM (para total curarização). PEG 400 em diferentes concentrações foram aplicados para se obter a curva dose-resposta (3 μM, 20 μM e 100 μM). Nesta preparação, fármacos clássicos em junção neuromuscular foram utilizados como ferramentas farmacológicas, tais como, neostigmina (12 μM) e dantrolene (30 μM).

Utilizou-se preparações BC de pintainho, por meio da técnica miográfica, sob estimulação elétrica indireta, baseado no conhecimento dos efeitos das drogas neostigmina (ação anticolinesterásica) e d-Tubocurarina (bloqueador neuromuscular competitivo), na concentração 20 μM de PEG 400 e comparou-se com os controles Krebs e neostigmina 12 μM.

Utilizou-se preparação BC de pintainho, dantrolene (30 μM), seguido de PEG 400 (20 μM), cuja resposta contrátil apresenta facilitação mantida na técnica miográfica.

3.5- Técnica histológica (microscopia óptica)

Os músculos provenientes da técnica miográfica com preparações BC foram, ao seu final, fixados em Solução de Bouin por 24 h, lavados com solução de amônia e preservadas em álcool 70%, para posterior análise histológica, seguindo os procedimentos usuais de histologia: desidratação, inclusão em historesina (Leika NuBloch/Heidelberg, Alemanha), confecção de blocos, microtomia (micrótomo Leika RM 2035) em secções de 2 μm de espessura, preparação de lâminas e coloração com azul de toluidina 0.5% (Vetec, São Paulo) e Bórax 5% (Quimesp, São Paulo).

Um software para a captura de imagens (image Pro Plus 6.0, Mídia Cybernetics Inc.) foi utilizado acoplado a um microcomputador e assim fotografadas em fotomicroscópio Zeiss Axiophot.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico (Olimpus BX51) e analisadas por três examinadores. As alterações morfológicas foram quantificadas pela contagem do número de células lesadas e expresso em porcentagem do número total de células em três áreas não superpostas, não adjacentes de cada músculo. Esse procedimento foi usado em todos os experimentos controle e tratado (n=3, cada).

3.6- Técnica eletrofisiológica

A técnica do músculo cortado, proposta primeiramente por Barstad (1962) modificada para camundongos por Banker et al. (1983) foi utilizada para impedir a propagação do potencial de ação muscular, evitar o processo contrátil e permitir a captação do potencial de placa terminal. Fixou-se o conjunto (músculo cortado e nervo) horizontalmente por meio de alfinetes, em cuba revestida de resina e silicone (Dow Corning-Sylgard) e preenchido com solução nutritiva de Tyrode. Manteve-se em temperatura ambiente, e aerou-se a preparação com carbogênio. Observaram-se as preparações antes e após a adição de PEG a 1 µM e 10 µM (To, T_{15}, T_{45}, T_{60} min), concentrações eleitas após ensaios-piloto com PEG 400 a 20 µM, que dificultaram a resposta basal por 60 minutos, utilizando lupa (Wild m 7 S-Switzerland) de capacidade para aumento de 40 vezes. Utilizou-se a técnica Fatt e Katz (1951) com introdução de microeletrodos de vidro intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio de micromanipulador Leitz, para a obtenção do potencial de placa terminal (PPT), em resposta à estimulação elétrica indireta (10 V, 0,2 ms, 1 Hz), por meio de eletrodo de platina posicionado de modo a sugar o coto distal do nervo frênico, sendo utilizado o software AqDados 4 (Lynx) para registro e armazenamento dos dados em computador para posterior análise.

3.7- Registro do potencial de membrana (PM)

Para a medida do potencial de membrana das fibras musculares, os microeletrodos foram inseridos intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio do microscópio, fazendo a medida do deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da inserção. Além disso, o potencial de membrana foi monitorado digitalmente por intermédio do software já descrito. O mesmo procedimento foi repetido em cinco fibras distintas em um período de 1 minuto como padrão. O estudo dos efeitos induzidos pelo PEG 400 (20 µM e 100 µM, esta tratada anteriormente com d-Tc, 6 µM) sobre o potencial de repouso da fibra muscular foi feito nos tempos zero (controle), t_{15}, t_{30}, t_{45} e t_{60} min.

3.8- Análise do conteúdo quântico (CQ)

O conteúdo quântico do Potencial de placa terminal (PPT) corresponde ao número de "unidades quânticas", cujo somatório deu origem a esse PPT. Os cálculos relativos ao conteúdo quântico dos potenciais de placa terminal foram realizados após a correção dos PsPT para a somatória não-linear de quanta (quantidade de vesículas de acetilcolina liberadas na fenda sináptica), de acordo com a seguinte fórmula (Elmqvist e Quastel, 1965), nos tempos zero (controle), T_{15}, T_{30}, T_{45} e T_{60} min.

PPT' = [(PPT x (PM-PE)] / (PM-PE-PPT)

Onde:

PPT' = PPT corrigido

PPT = PPT observado

PE = potencial de equilíbrio, que foi considerado -5 mV (Miyamoto, 1975)

PM = potencial de membrana

3.9- Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Para a significância das diferenças observadas foram utilizados a Análise de Variância para medidas repetidas ANOVA (*Repeated Measures*), com valor $p < 0,05$ considerado significativo, comparando os tratamentos e as medidas ao longo do tempo.

4- RESULTADOS

4.1- Curva concentração-resposta do PEG 400 em preparações neuromusculares isoladas de camundongo e de pintainho

A Figura 1 ilustra a curva concentração-resposta do PEG 400 em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo (Fig. 1A) e biventer cervicis de pintainho (Fig. 1B). Diferentes concentrações de PEG 400 (3, 20 e 100 μM) dissolvidos em solução nutritiva (Tyrode ou Krebs), produzem quase que imediatamente um aumento da resposta contrátil, mesmo com concentrações baixas quanto às de 3 μM ($p < 0,05$ em relação ao controle Krebs, principalmente nos tempos de 20 a 60 minutos de incubação). A facilitação inicial observada pode causar diferentes efeitos sobre a resposta contrátil e é dependente da concentração. Aquelas de 3 e 20 μM retornam ao nível basal (camundongos) ou mantêm a resposta facilitatória (pintainhos), durante 60min, enquanto que a concentração de 100 μM induz um bloqueio neuromuscular completo ligeiramente mais rápido (10min) em camundongos do que em pintainhos (30min). Nessa concentração, um efeito contraturante foi observado em todos os experimentos realizados em preparações de ave (n=6). Esses resultados tomados em conjunto revelam uma maior sensibilidade da preparação NFD à ação do PEG, quando comparada a de aves. A lavagem (w) sucessiva das preparações com novas soluções nutritivas de Tyrode ou de Krebs é suficiente para a completa remoção do PEG 400 e para a reversão das respostas musculares à condição controle.

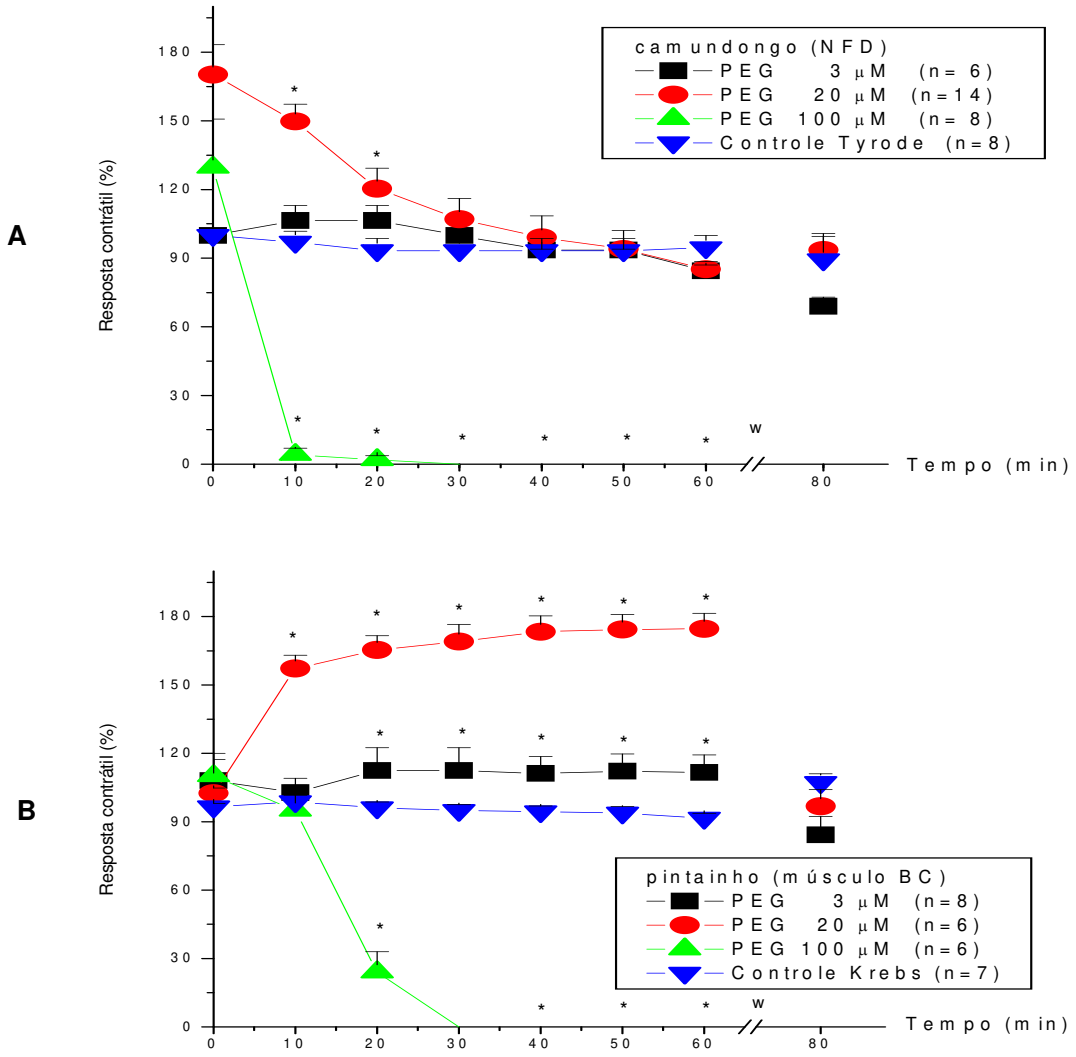


Figura 1- Gráfico representativo da curva concentração-resposta do PEG 400 em preparações neuromusculares de ave e de mamífero, sob estímulo elétrico indireto. (A) Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos. (B) Preparação biventer cervicis de pintainhos. Efeito facilitatório inicial é observado rapidamente quando adicionado o PEG 400 dissolvido em solução nutritiva, para respostas mantidas (pintainhos) ou não (camundongos) com 3 e 20 µM ou bloqueio neuromuscular com 100 µM. Cada ponto representa a média ± erro-padrão. O número de experimentos é mostrado na legenda das figuras. (w, lavagem; PEG, polietilenoglicol; *, $p < 0,05$).

4.2- Atividade do PEG 400 avaliada através de técnica eletrofisiológica

O Polietilenoglicol (PEG 400) foi investigado através de técnica eletrofisiológica, para capturar biopotenciais, tais como Potencial de membrana (mostrados à pág. 40) e Potencial de Placa Terminal (PPT), necessário para a obtenção do Conteúdo Quântico (CQ), conforme ilustrado na Figura 2.

A Figura 2A ilustra os efeitos do PEG 400 na concentração de 1 μM sobre o CQ, que apresentou um aumento da amplitude dos PPT evocados nos 30 minutos iniciais, não significativo e retornou ao nível basal ao longo do experimento, e a concentração de 10 μM não ocasionou aumento das respostas evocadas ao longo de 60 minutos de observação, Figura 2B. Ambas as concentrações utilizadas não apresentaram diferença significativa em relação ao controle Tyrode ($p > 0,05$).

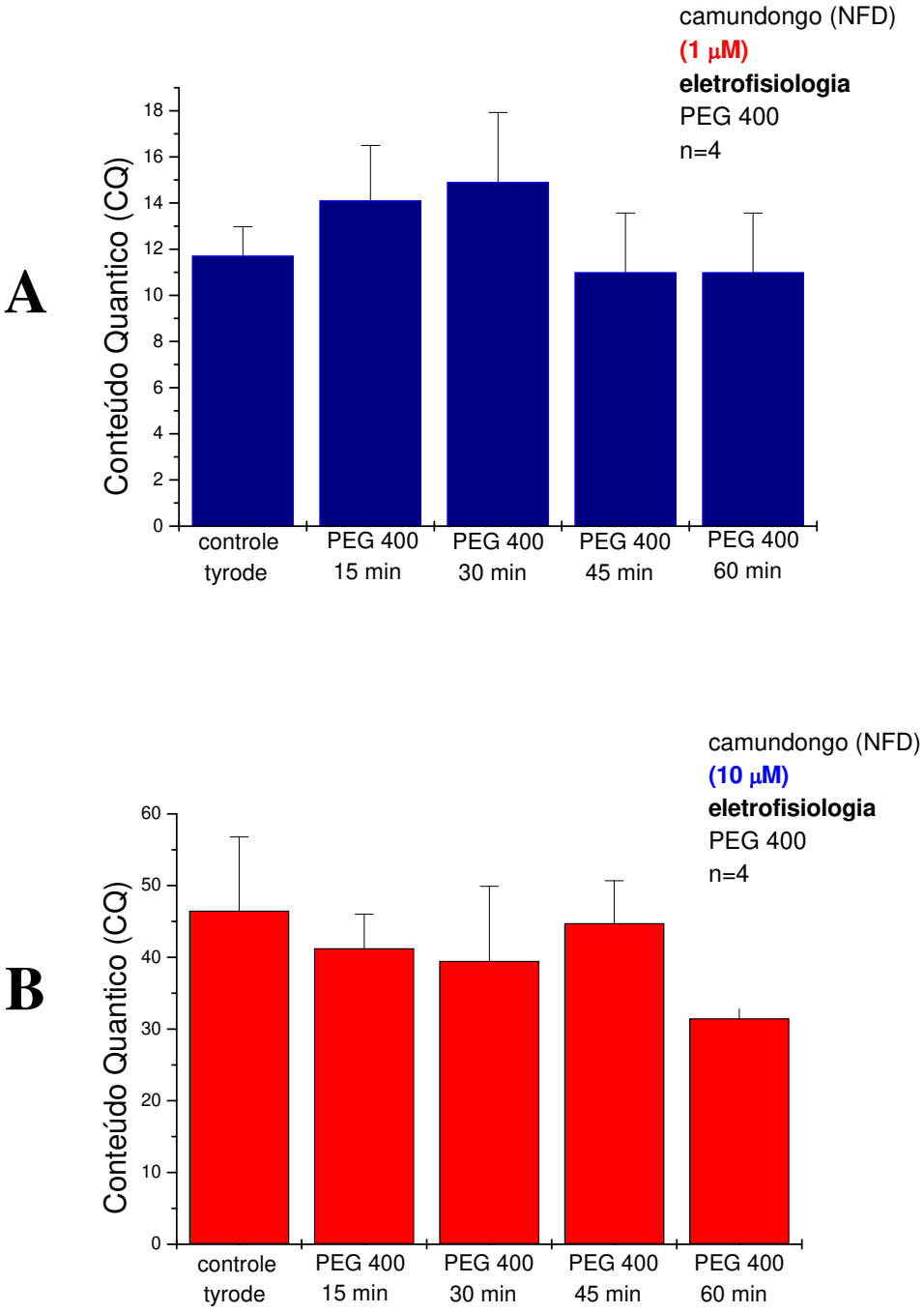


Figura 2- Conteúdo Quântico (CQ) em preparação NFD de camundongo, técnica do músculo cortado, com adição do PEG 400 após o controle Tyrode, nos tempos 15, 30, 45 e 60 minutos. (A) 1 μM e (B) 10 μM de PEG 400 (n=4, $p > 0,05$).

4.3- Protocolo para avaliação de ação anticolinesterásica do PEG 400

A Figura 3 mostra os registros miográficos representativos das preparações que foram tratadas com d-Tc (Fig. 3A, 6 μM) (n=6), d-Tc seguido de neostigmina (Fig. 3B, 12 μM) (n=4) e d-Tc seguido de PEG 400 (Fig. 3C) (n=6). Os resultados para o PEG 400 (20 μM) mostraram efeito contrário aos do anticolinesterásico utilizado. Enquanto a neostigmina reverteu o efeito do curare, o PEG 400 manteve o bloqueio neuromuscular semelhante ao da d-Tc sozinha.

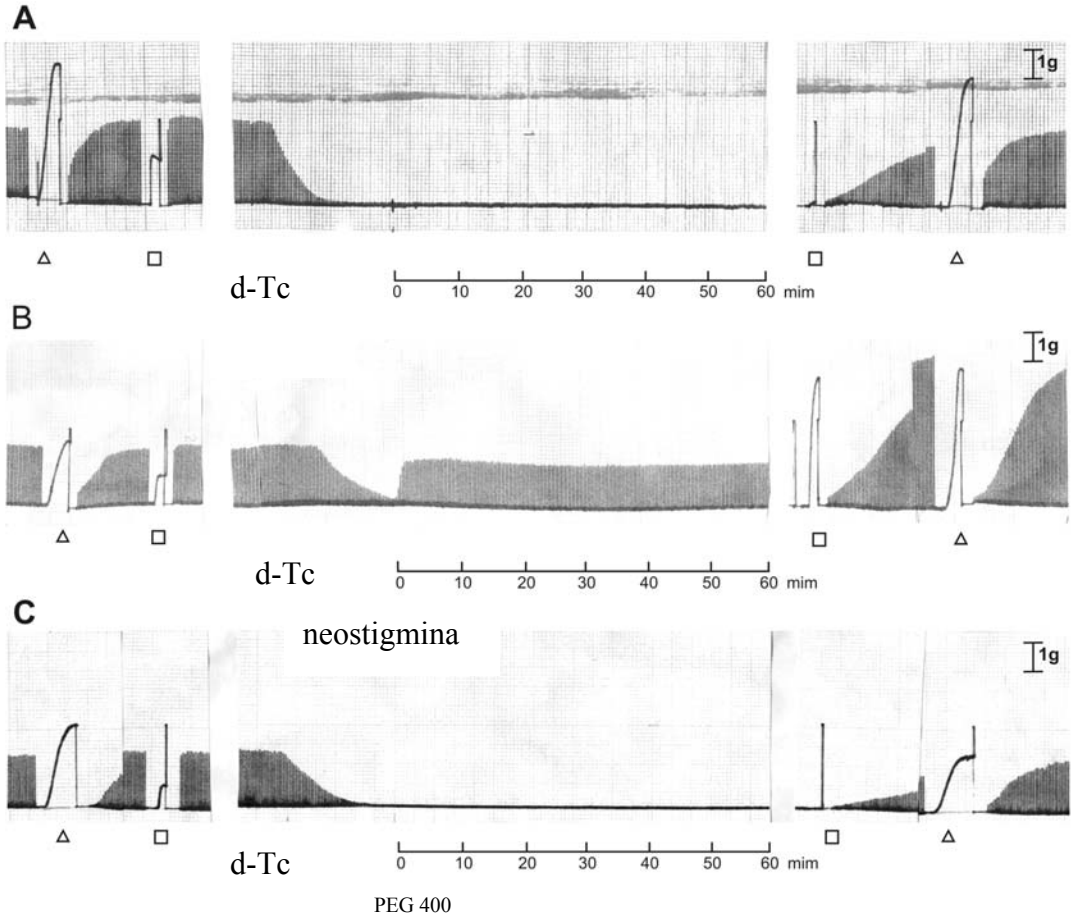


Figura 3- Experimentos em preparações curarizadas (d-Tc, 6 μM) músculo biventer cervicis de pintainhos, estímulo indireto (técnica miográfica). (A) Controle Krebs (n=6), (B) neostigmina (12 μM) (n=4) e (C) PEG 400 (20 μM) (n=6). Observa-se que o PEG 400 não tem a mesma ação anticolinesterásica da neostigmina. Δ KCl, □ ACh, tempo zero= momento da adição da nestostigmina ou PEG 400. Tensão = 1g.

4.4- Resposta à adição exógena de ACh e KCl

A preparação de ave forneceu dados adicionais quanto à resposta contraturante à adição exógena de ACh e KCl, em função do tipo de inervação, que é múltipla, ao contrário da preparação de camundongos. As concentrações de 3 μM (n=8) e 20 μM (n=6) não alteraram a resposta contraturante à adição de ACh, porém alteraram a resposta contraturante frente à adição de KCl, 3 μM (80 ± 4,3%) e 20 μM (123 ± 12 %), ($p < 0,05$) (Fig. 4), enquanto as preparações tratadas com PEG 400 em elevadas concentrações (100 μM, n=6) causaram bloqueio total tanto às respostas contraturantes de ACh quanto às do KCl. Estes resultados indicam que a facilitação possa ocorrer em função do PEG melhorar a excitabilidade da membrana por ação direta e não por uma ação pós-sináptica sobre receptores nicotínicos.

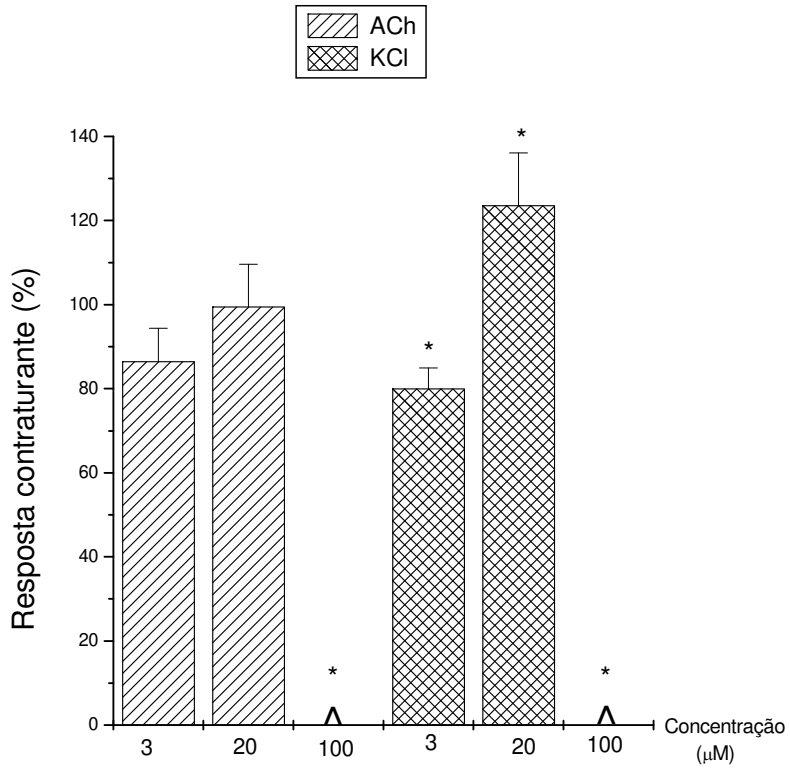


Figura 4- Respostas contraturantes à adição exógena de ACh e KCl em preparações BC tratadas com PEG 400 em diferentes concentrações (3, 20 e 100 μM). * $p < 0,05$ em relação à condição controle (100%, antes do tratamento). Δ, bloqueio total. PEG, Polietilenoglicol.

4.5- Preparação biventer cervicis de pintainho (estímulo direto)

Protocolos usando estimulação elétrica direta foram realizados com a finalidade de elucidar os fenômenos de facilitação e bloqueio neuromuscular induzidos pelo tratamento com PEG 400 (20 μM, n=4 e 100 μM, n=8). A Figura 5 ilustra registros miográficos representativos da média do número de experimentos realizados. Preparações tratadas com 20 μM apresentaram o mesmo perfil daquele obtido sob estímulo indireto (facilitação inicial, com retorno da resposta contrátil aos níveis basais após a lavagem da preparação). A diferença observada quando ensaiou-se o PEG 400 em concentração elevada (100 μM) foi o aparecimento de contratura concomitante à facilitação inicial, seguida de bloqueio neuromuscular. O tempo para causar um bloqueio neuromuscular de 50% (T50) foi de 23 ± 4,3 min, sem diferença significativa com o mesmo protocolo realizado sob estímulo elétrico indireto, cujo T50 foi de 15 ± 1,4 min (n=6).

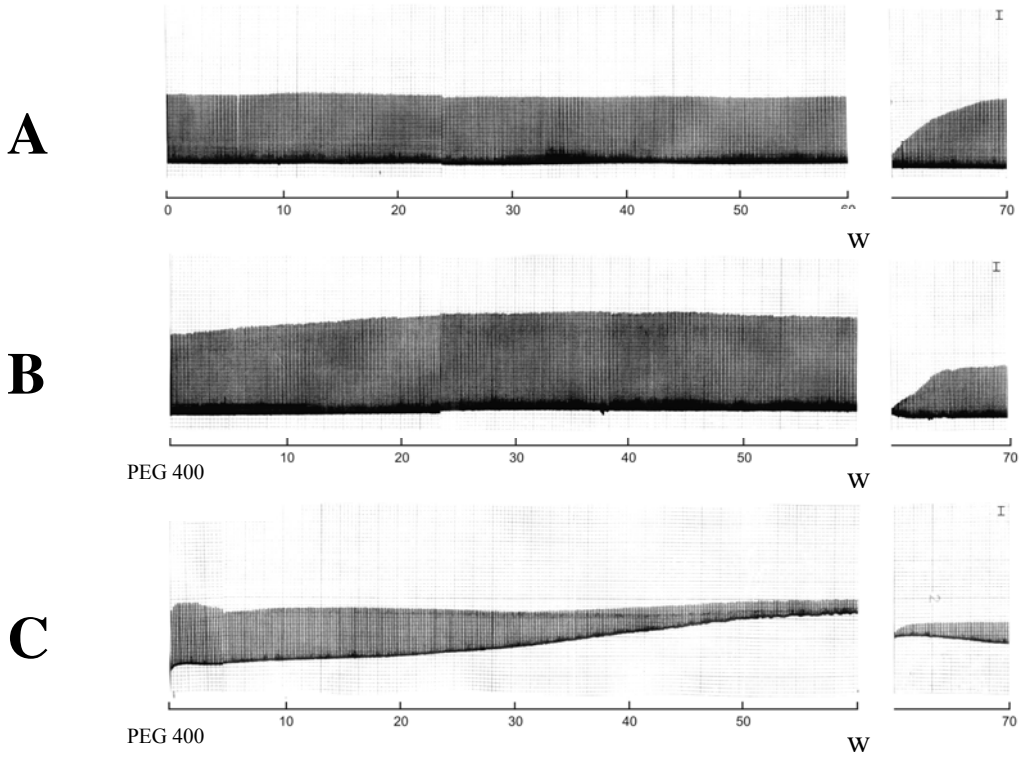


Figura 5- Registro miográfico representativo da preparação BC de pintainho sob estimulação elétrica direta. Figura 5A representa o Controle Tyrode, Figuras 5B e 5C, representam as preparações expostas às concentrações de PEG 400 20 µM e 100 µM, respectivamente. O tempo zero representa o momento da adição do PEG 400 em B e C. Note o nível de recobro da resposta contrátil após a lavagem, nos diferentes tratamentos. Tensão = 1 g, 20 V e 2 ms. (n=6 para A, B e C); w, lavagem.

4.6- Potencial de membrana em repouso

As preparações controle mantiveram os valores dos potenciais de membrana em - 83 ± 1,5 mV ao longo do experimento, no entanto, a adição do PEG 400 na concentração de 20 μM (Fig. A) induziu a um efeito despolarizante da preparação NFD após 30 min, em -70 ± 1,6 mV, enquanto a preparação que foi pré tratada com d-Tc (6 μM), para a obtenção do bloqueio total e possibilitar a avaliação dos valores do potencial de membrana em repouso da fibra muscular, na concentração de 100 μM (Fig. B), induziu uma diminuição do potencial de repouso, portanto um efeito despolarizante da ordem de - 16 ± 1,7 mV, que foi observado logo após 15 minutos de incubação com o polietilenoglicol e que se manteve durante os 60 min de observação.

Os resultados mostraram alterações significativas do potencial de membrana após 30 min e 15 min de incubação com 20 μM e 100 μM, respectivamente.

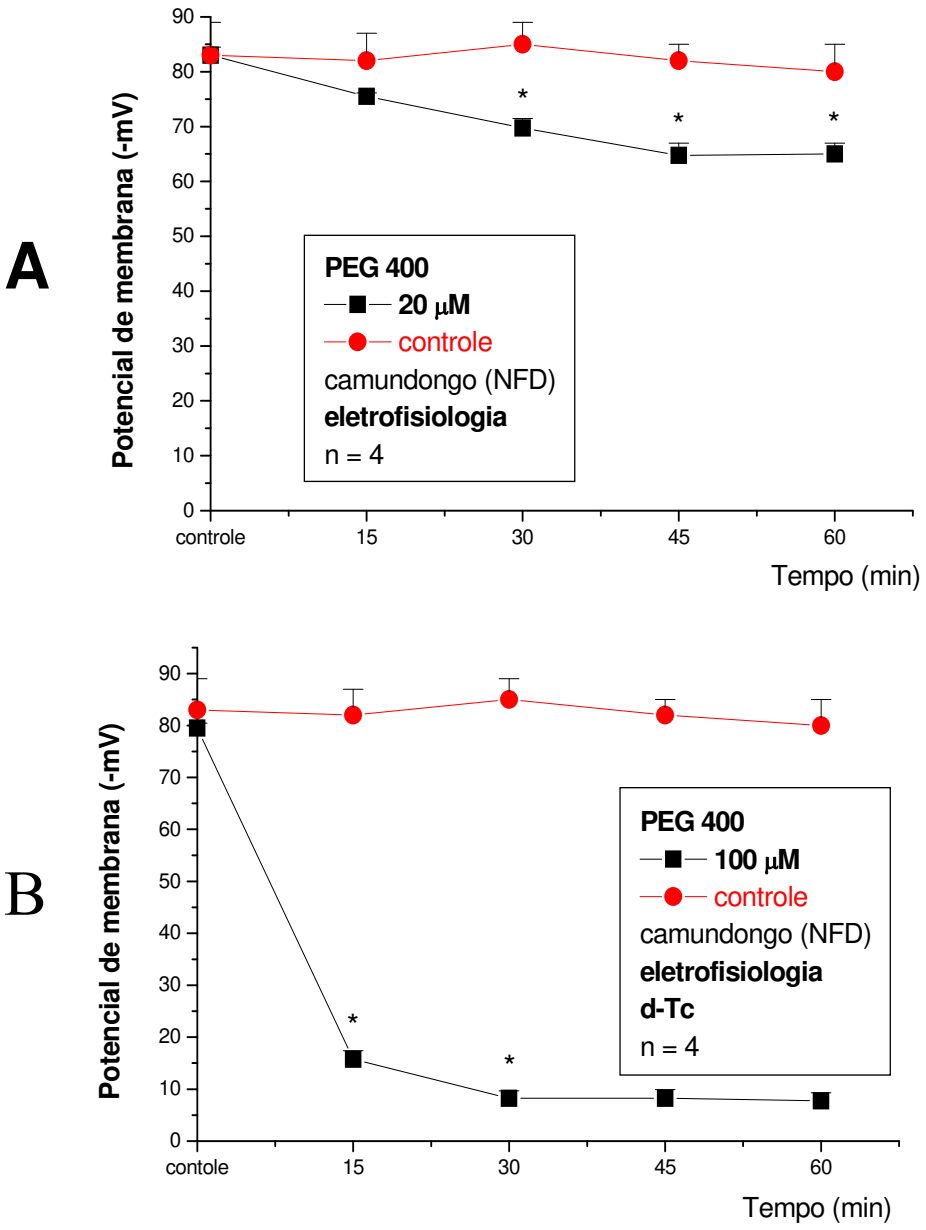
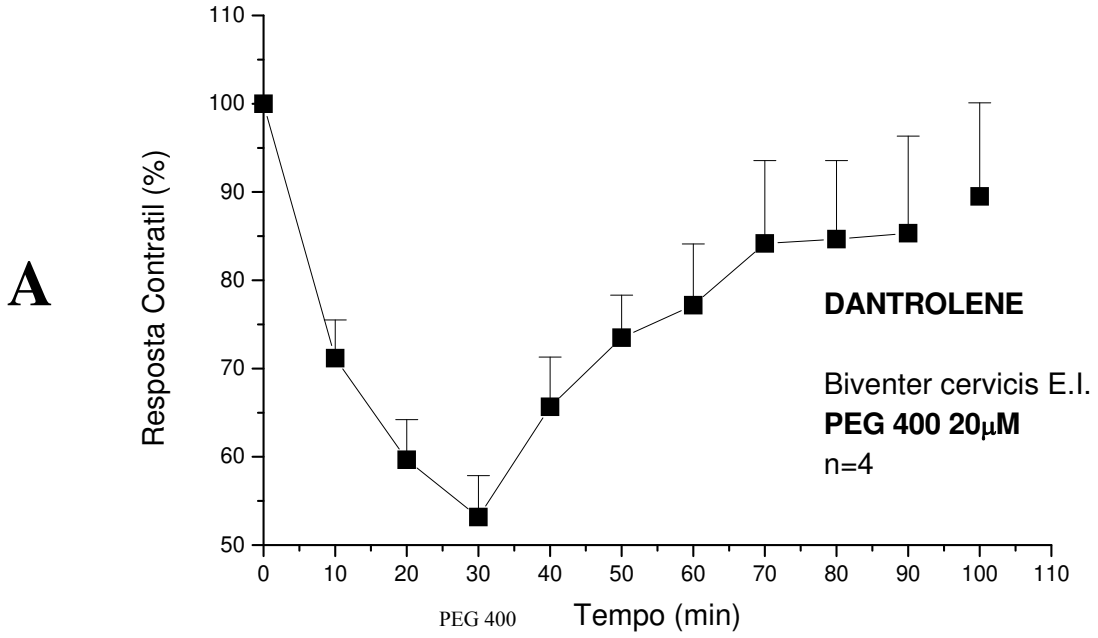


Figura 6- Medidas do potencial de membrana no músculo diafragma de camundongo (NFD). Na Figura A, adição de PEG 400 na concentração de 20 µM (n=4) após o registro inicial controle Tyrode pelos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos. A figura B representa o experimento utilizando o pré-tratamento com d-Tubocurarina (6 µM) e adição de PEG 400 na concentração de 100 µM (n=4). *, $p < 0,05$.

4.7- Protocolo com dantrolene

Com a adição de dantrolene (30 μM), foi observado um bloqueio neuromuscular de 47 ± 4,7%, após 30 minutos (Fig. 7). Após a adição do PEG 400 (20 μM), observa-se uma reversão das respostas contrácteis em resposta à adição do dantrolene, ocorrendo portanto, um efeito de reversão sobre a resposta de contração muscular da ordem de 35 ± 10,1% ($p < 0,05$).



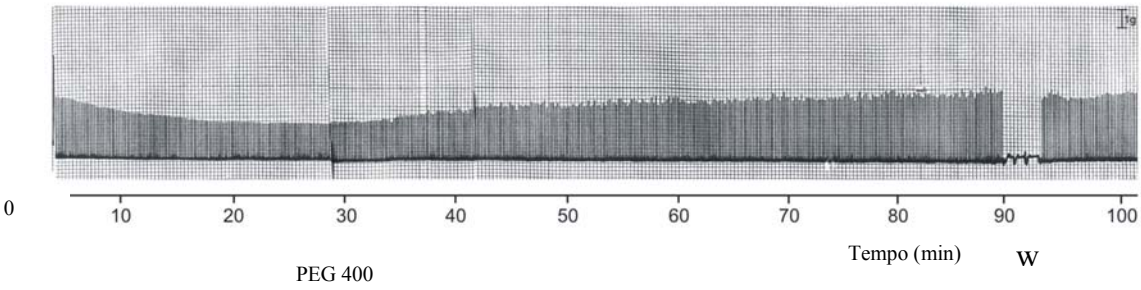


Figura 7- Preparações biventer cervicis tratadas com dantrolene, seguidas da adição de PEG 400 (30min), sob estimulação elétrica indireta. (A) dantrolene na concentração 30 μM causou bloqueio parcial próximo de 47% e aos 30 minutos adicionou-se PEG 400 a 20 μM. (B) registro miográfico representativo da condição acima. Note que o PEG 400 antagonizou o efeito do dantrolene à resposta contrátil ($p < 0,05$). Tensão 1g.

4.8- PEG 400 a 100 µM em preparação BC

Este protocolo experimental foi realizado com intuito de pesquisar o bloqueio total causado pela concentração de 100 µM de PEG 400 na preparação BC, concentração que também causa bloqueio total na preparação NFD de camundongo. Foi utilizada, a d-Tc (6 µM) e em seguida, a preparação foi estimulada diretamente (20 V, 2ms). Após a estabilização foi adicionado o PEG 400 (100 µM) por um período de 60 minutos.

A Figura 8 mostra o traçado do registro miográfico com o tratamento de PEG 400 (100 µM) sob estimulação elétrica direta. Observou-se um bloqueio da resposta muscular, acompanhado de uma importante contratura ao longo do experimento, que não retornou à linha de base mesmo após sucessivas lavagens e adição exógena de ACh e KCl.

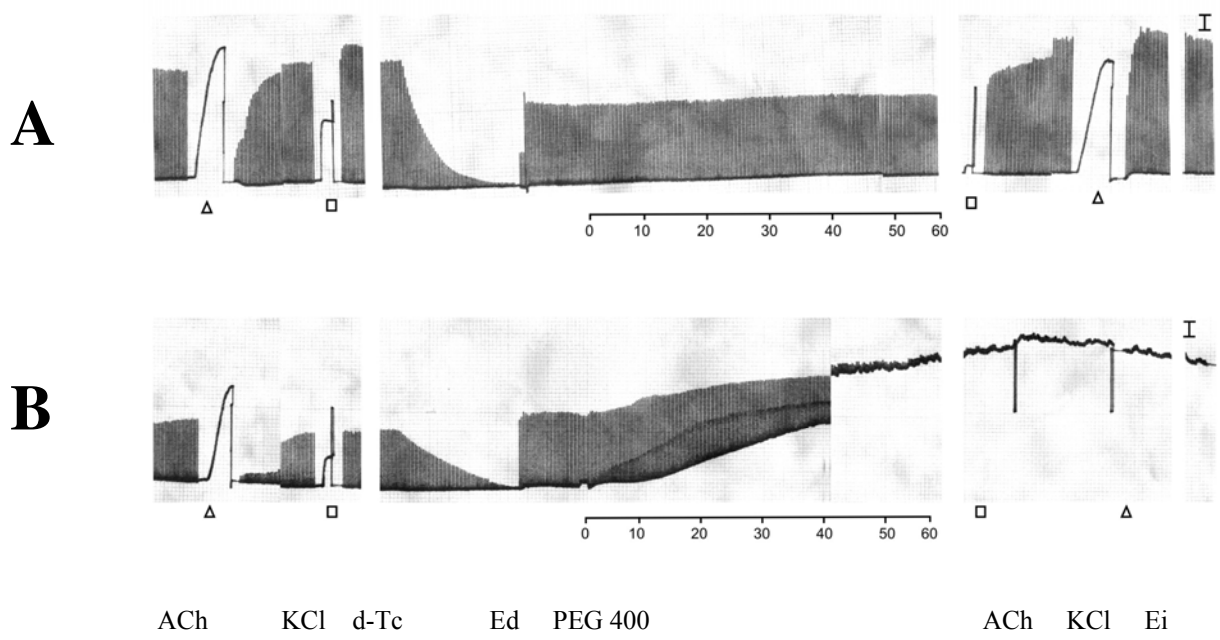


Figura 8- Figuras representativas de miografias na preparação BC de pintainho, sob estimulação elétrica direta (20 V, 2ms). (A) Controle Krebs e (B) adição de PEG 400 (100 µM) observado por 60 minutos. Note que a preparação tratada com PEG 400 não retornou à linha de base, mesmo após lavagens com solução nutritiva. Ei, estimulo indireto, Ed, estimulo direto. Barra (Tensão=1g).

4.9- PEG 400 a 20 µM e 100 µM em preparação NFD

Este protocolo experimental foi realizado para estudo do bloqueio total na preparação NFD em camundongos, sob estimulação elétrica direta, nas concentrações de 20 µM (Fig. A) e 100 µM (Fig. B) de PEG 400, objetivando complementar o estudo anterior em preparações BC de pintainho. O uso da d-Tc também foi utilizado para ocupar os receptores nicotinicos e visualizar os efeitos do PEG sobre as contrações musculares em resposta ao estímulo elétrico direto na fibra muscular.

A Figura 9 mostra o registro miográfico da preparação NFD, incubada com o PEG 400 20 µM (Fig. 9A), sem apresentar bloqueio da resposta muscular. Em 100 µM (Fig. 9B) houve bloqueio da contração muscular e uma pequena contratura ao longo do experimento. Após a lavagem com solução nutritiva obteve-se um retorno dessa resposta diferentemente da resposta à preparação BC, que não houve retorno da resposta muscular, após a lavagem.

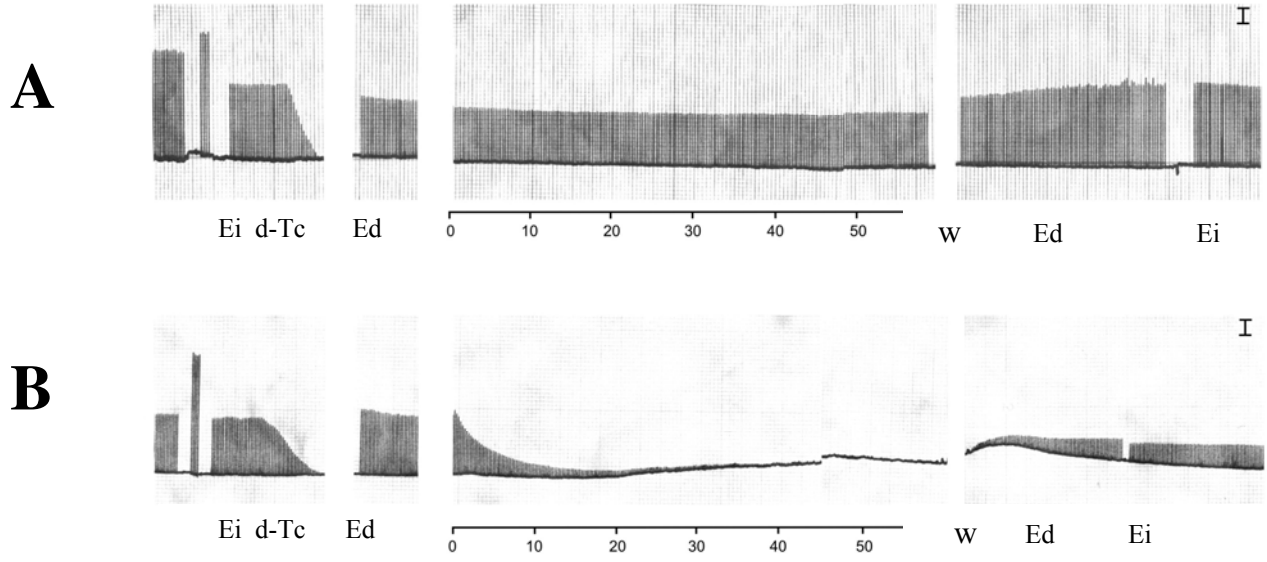


Figura 9- Registro miográfico representativo de protocolos experimentais em preparações NFD, sob estimulação elétrica direta. O PEG 400 foi adicionado (Tempo zero) nas concentrações de (A) 20 µM e (B) 100 µM. Note que o bloqueio total ocorreu em 100 µM com um breve efeito contraturante e pequeno retorno da resposta muscular pós lavagem (n = 6). W, lavagem, Ei, estimulo indireto, Ed, estimulo direto, Barra= 5g

4.10- Análise morfológica do músculo biventer cervicis de pintainho

A Figura 10 ilustra secções transversais de preparações músculo biventer cervicis de pintainho. Nos músculos que foram incubados com solução nutritiva de Krebs (controle) observaram-se 3,6 ± 0,5% de fibras alteradas. Quando os músculos foram tratados com PEG 400 nas concentrações de 3 µM, 20 µM e 100 µM, apresentaram 2 ± 0,6 %, 5,2 ± 0,6% e 4,3 ± 0,9% de alterações, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os protocolos controle e tratado ($p > 0,05$).

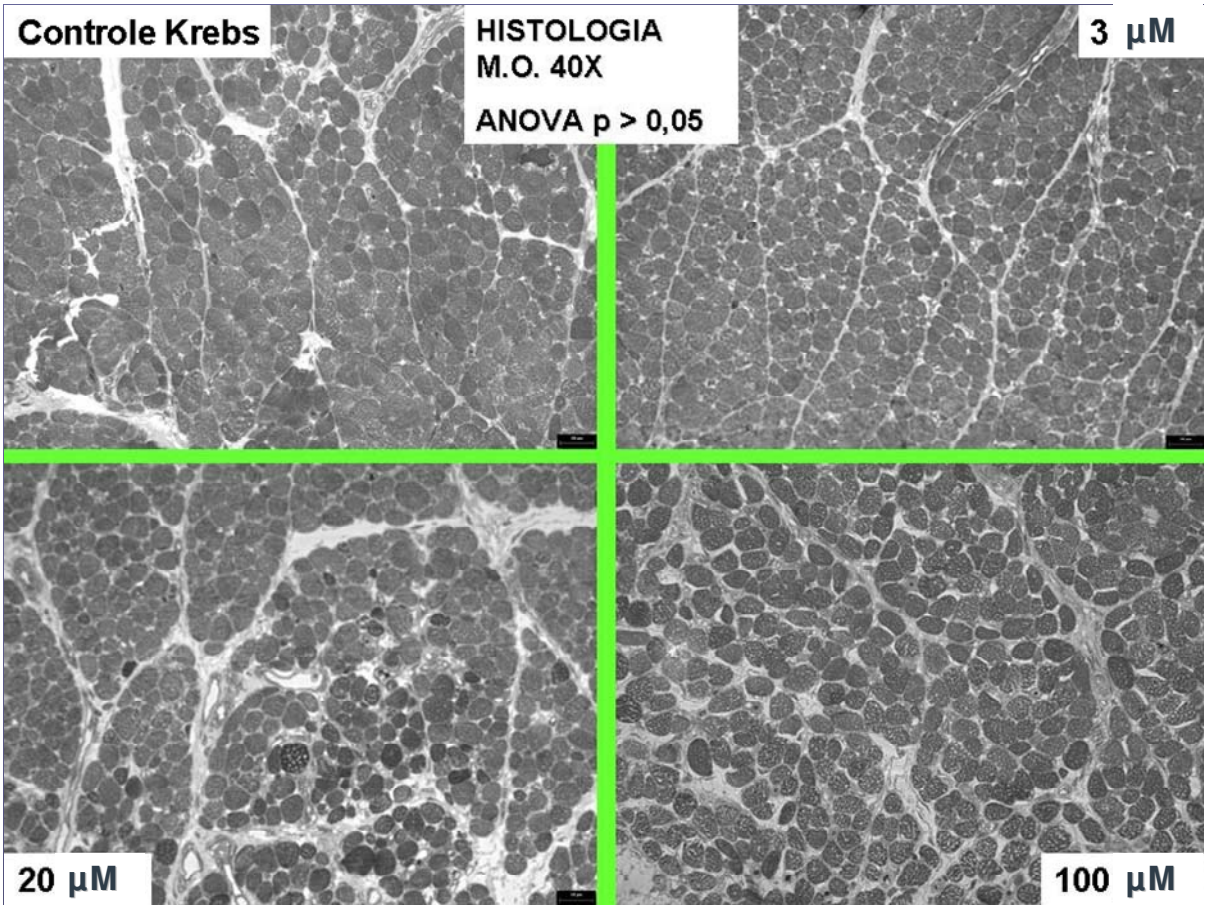


Figura 10- Figura representativa de cortes do músculo biventer cervicis de pintainho exposto à solução Krebs (controle Krebs), 3 µM, 20 µM e 100 µM de PEG 400. Note que não foram observadas alterações morfológicas nos tratamentos ($p > 0,05$). Barra= 20 µm.

5- DISCUSSÃO

5.1- Técnica miográfica

O PEG 400, quando adicionado em preparações neuromusculares para o regsitro miográfico, é capaz de produzir efeitos concentração dependente, e ocorrem diferenças importantes entre as preparações nervo frênico diafragma (NFD) de camundongos e músculo biventer cervicis (BC) de pintainhos. A concentração de 3 µM, mostrou-se sem efeito aparente sobre a preparação NFD e foi a utilizada por Cintra Francischinelli et al. (2008) para a solubilizar o extrato hidroalcoolico das folhas da planta *Casearia sylvestris*, popularmente conhecida como guaçatonga. Na preparação BC, a concentração de 3 µM já apresentou um efeito evidente facilitador da neurotransmissão, e na concentração de 20 µM causou efeito facilitador em ambas as preparações. Assim, em preparações de camundongo houve retorno da resposta contrátil ao nível basal, ao passo que na preparação de ave a facilitação foi mantida até o final do experimento. Esta diferença pode ser interpretada como sendo em virtude do tipo de preparação utilizada, pois diferem quanto ao tipo de inervação que exibem. Harvey et al. (1994) consideram a preparação BC vantajosa no estudo de venenos e toxinas, quando comparada à preparação NFD de camundongo, especialmente quando tal estudo se destina a diferenciar os seus mecanismos de ação pré e/ou pós-juncionais. A importância da diferença de inervação destas preparações é que poderá resultar nas diferentes respostas farmacológicas, quando expostas às concentrações de substâncias semelhantes (Rodrigues et al., 2004). Diferença de resposta na sensibilidade das preparações também foram evidenciadas na concentração de 100 µM, sendo que a preparação diafragma de camundongo exibiu um bloqueio neuromuscular completo ocorrido 15 min antes que o na preparação de ave.

Os experimentos foram observados por 60 minutos, e assim padronizadas tanto para experimentos sob a técnica miográfica quanto os sob a técnica eletrofisiológica, pois neste período foi possível a observação dos eventos nas preparações neuromusculares utilizadas.

Quando as preparações BC e NFD foram lavadas, após 60 minutos de registro, foram lavadas com solução nutritiva de Krebs ou de Tyrode respectivamente, verificou-se um retorno da atividade contrátil (exceto na concentração de 100 µM), e esses eventos comprovam que o PEG 400 não exibe qualquer ação lesiva às preparações

neuromusculares. Este resultado corrobora àquele obtido através do estudo histológico que mostrou ausência de alteração morfológica.

Vale lembrar, também, que foram realizados outros protocolos experimentais em diferentes concentrações, usando-se a técnica miográfica, mas com resultados similares à concentração de 20 µM, o que levou à escolha das concentrações de 3, 20 e 100 µM para o prosseguimento do estudo do PEG.

Os diferentes efeitos farmacológicos alcançados do PEG 400 na técnica miográfica, das preparações neuromusculares de pintainhos (3 µM, 20 µM e 100 µM), foram também avaliados morfologicamente.

5.2- Técnica eletrofisiológica

A técnica eletrofisiológica pode fornecer informações que indicam o sítio de ação de substâncias ou toxinas na junção neuromuscular. A preparação nervo frênico diafragma de camundongo exibe fibras de pequeno diâmetro, o que determina a manutenção somente por um curto de período de tempo de empalamento; diferente das fibras de rã, que são grandes (Rodrigues-Simioni et al., 1983), e uma vez empaladas (inserção do microeletrodo na fibra muscular) mantém-se dessa forma até o final do experimento.

A utilização da eletrofisiologia nos estudos do PEG 400 foi para observar a influência da concentração, uma vez que Geron e Meiri (1985) encontraram atividade pré sináptica utilizando PEG 8000 na concentração de 12,5 mM.

A concentração de 10 µM de polietilenoglicol foi condizente com os efeitos facilitatórios observados na técnica miográfica em preparações NFD, mas neste tipo de preparação ocorre o retorno da resposta contrátil para o nível basal ao longo do experimento. Nas concentrações de 15 µM e 20 µM não foi possível a captação dos biopotenciais pela dificuldade de empalamento.

Nas concentrações de 1 µM e 10 µM não se observou diferenças significativas quando os tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos após a adição do PEG 400 foram comparados com o controle Tyrode ($p > 0,05$). Portanto, os achados do presente estudo não corroboraram a atribuição de atividade pré-sináptica do PEG 400 por meio de estudos eletrofisiológicos, no que diz respeito ao estudo da variação do PPT (potencial de placa terminal), para a medida do conteúdo quântico (CQ), que é a quantidade de liberação de vesículas de neurotransmissor (Acetilcolina) na fenda sináptica.

5.3- Estudo da atividade anticolinesterásica

As drogas anticolinesterásicas, por inibirem a enzima que hidrolisa a acetilcolina, propiciam maior concentração dessa substância nas placas terminais após cada impulso nervoso e permanece por muito mais tempo nos receptores na membrana subsináptica (Eccles e MacFarlane, 1949). Quando esta enzima, acetilcolinesterase, é inibida, ocorre um aumento significativo da amplitude da resposta contrátil.

Foi utilizada a d-Tubocurarina (6 µM), para bloqueio total em preparações de BC para comparação com o anticolinesterásico neostigmina (12 µM) e com a ação do PEG 400 (20 µM). Não foi observado o mesmo efeito de reversão da resposta contrátil quando foi utilizado o polietilenoglicol 400; já com a adição da neostigmina foi observada a reversão do bloqueio neuromuscular, pelo fato que as drogas anticolinesterásicas possibilitam o aumento da concentração de acetilcolina na fenda sináptica, que por sua vez desloca a d-Tubocurarina dos receptores nicotínicos por mecanismo competitivo.

Por intermédio desse protocolo experimental foi evidenciado que o PEG 400 (20 µM) não apresenta ação anticolinesterásica.

5.4- Estudo da atividade pós sináptica

5.4.1- Resposta contraturante à adição exógena de ACh e KCl

Após a observação da ausência dos eventos pré-sinápticos, foram analisadas as curvas de acetilcolina (ACh) e de Cloreto de potássio (KCl) para avaliar, respectivamente, eventos sub-sinápticos e pós-sinápticos, em preparações neuromusculares de pintainhos,

por possuir inervação multifocal e apresentar vários receptores ao longo da sua fibra. Esta preparação exibe respostas contraturantes à adição exógena de ACh (permite avaliar a integridade do receptor nicotínico) e KCl (permite avaliar a integridade do sarcolema), não observadas usando-se outras preparações como a de mamífero (Harvey et al., 1994).

As respostas contraturantes à ACh e KCl foram analisadas após a adição do PEG 400 (3 µM, 20 µM e 100 µM). Para as respostas à ACh não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às contraturas controle. Desse modo, não houve efeito do PEG 400 sobre receptores nicotínicos, mas sobre as fibras musculares, pois apresentou diferença estatística entre as contraturas em resposta à adição de KCl quando comparadas aos controles ($p < 0,05$). Na concentração PEG 400 (100 µM), contudo, houve bloqueio das respostas contraturantes tanto à ACh quanto ao KCl.

5.5- Estímulo direto em pintainhos (músculo biventer cervicis)

Este estudo foi realizado em razão dos indicativos de uma ação do PEG 400 sobre a fibra muscular através de observações usando-se a técnica miográfica, sob estímulo elétrico direto. Com o uso da d-Tc (6 µM), exclui-se a participação do receptor nicotínico e os efeitos sobre a fibra muscular podem ser avaliados isoladamente.

Com a adição do PEG 400, os resultados obtidos foram similares aos experimentos sob estimulação indireta, evidenciando sua ação direta sobre a fibra muscular.

5.6- Registro do potencial de membrana

O potencial de membrana é uma técnica utilizada para evidenciar as despolarizações que ocorrem no sarcolema. Com a adição do PEG 400 (20 µM) e PEG 400 (100 µM pré tratada com d-Tc), foram evidenciadas diferenças significativas ($p < 0,05$), quando comparadas ao potencial de membrana em repouso (controle). O PEG 400 (20 µM) induziu um efeito despolarizante, de forma significativa. Quando usado o PEG 400 (100 µM), despolarização ocorreu a partir dos 15 minutos, mesmo na presença da d-Tc. Ou

seja, o polietilenoglicol 400 apresenta um efeito despolarizante do sarcolema, mesmo quando os receptores nicotínicos estão ocupados pelo curare, evidenciando uma ação na fibra muscular.

5.7- Protocolo experimental com dantrolene

O dantrolene age diretamente sobre o músculo esquelético por interferir com a liberação do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; previne ou reduz o aumento da concentração do Ca^{2+} citosólico que ativa o processo catabólico agudo associado com hipertermia maligna (Britt et al., 1984; Langeron et al., 1999).

Em estudos anteriores utilizando a preparação NFD, o uso de dantrolene em 10 μM causou bloqueio neuromuscular de 70% (Oshima-Franco ET al.,2005). No presente estudo, sob estimulação indireta, as preparações BC foram previamente tratadas com dantrolene 30 μM, e observado um bloqueio de 50% em aproximadamente 30 minutos, após esse período foi analisado o efeito da resposta contrátil com a adição do PEG 400 (20 μM). Curiosamente, foi observado o fenômeno de reversão do bloqueio neuromuscular induzido pelo dantrolene.

Com estes achados, pode-se sugerir um mecanismo de ação pós-sináptico para a ação do PEG 400 na junção neuromuscular, tendo uma possível relação com a ação do cálcio sobre o mecanismo contrátil da fibra muscular.

5.8- Estudo da atividade bloqueadora (BC e NFD sob estímulo elétrico direto)

A ação do PEG 400 em preparações neuromusculares de camundongos e pintainhos é concentração dependente como mostrado neste trabalho, e o PEG 400 (100 μM) causa bloqueio total em ambas as preparações. Estas respostas ou resultados obtidos não foram suficientes para explicar exatamente os fenômenos de bloqueio neuromuscular dessas preparações, mas sugerem uma possível saturação das soluções nutritivas e/ou uma ação despolarizante persistente na presença do polietilenoglicol 400 (100 μM).

5.9- Análise morfológica

A análise morfológica das preparações BC não apresentou alterações em suas fibras musculares, quando tratadas com PEG 400 (3 µM, 20 µM e 100 µM) e comparadas com o controle Krebs ($p > 0,05$). Ressalta-se que mesmo na concentração de (100 µM), que apresentou bloqueio neuromuscular e ausência das respostas contraturantes à adição exógena de ACh e KCl, não foram observadas alterações morfológicas.

Murakami et al. (2007) demonstraram, por meio de experimentos *in vivo*, que o polietilenoglicol inibiu mais de 90% dos efeitos miotóxicos da bothropstoxina-I, que é a principal miotoxina encontrada no veneno de *Bothrops jararacussu*. Esses dados corroboram com a ausência dos danos morfológicos causados pelo PEG 400, uma vez que foi usado para avaliar atividade antimiotóxica.

6- CONCLUSÃO

- A ação pré-sináptica relatada na literatura (para PEG 8000) não foi estatisticamente confirmada neste estudo, sugerindo que o tamanho molecular do PEG 400 torne-o solúvel em membranas, mascarando possíveis alterações na liberação quântica do neurotransmissor.

- O efeito facilitatório demonstrado pelo PEG 400 deve-se à liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, mas não de inibição da enzima acetilcolinesterase.

- Elevadas concentrações de PEG 400 causam despolarização persistente, contratura e bloqueio neuromuscular completo, mas não mionecrose.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basanez G, FM, Alonso A. Poly(ethylene glycol)-lipid conjugates inhibit phospholipase C-induced lipid hydrolysis, liposome aggregation and fusion through independent mechanisms. FEBS Lett 1997; 411(2-3):281-286.

Banker BQ, Kelly SS, Robbins N. Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. J Physiol 1983; 339: 355-375.

Baldwin JM, O'Reilly R, Lucy JA. Ethanolamine inhibits the fusion of erythrocytes by (polyethylene glycol) 6000 and by cell swelling. Biochem Soc Trans 1992; 20(4):326S.

Barstad JAB. Presynaptic effect of the neurotransmitter. Experientia 1962; 18:579-580.

Boni LT, Hah JS, Hui SW, Mukherjee P, P. Ho JT, Jung Cy. Aggregation and fusion of unilamellar vesicles by poly(ethylene glycol). Biochim Biophys Acta 1984; 775(3): 409-418.

Blow AM, Bothan GM, Fisher D, Goodall AH, Tilcock CP, Lucy JA.Water and calcium ions in cell fusion induced by poly(ethylene glycol). FEBS Lett 1978; 94(2):305-310. Britt, B.A, Scott, E, Froidis, W, Clements, MJ, Enfrevyl, L-Dantrolene- *in vitro* studies in malignant hypertermia susceptible (MHS) and normal skeletal muscle. Can Anaesth Soc J 1984; 31:130-154.

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

Cintra-Francischinelli M, Silva MG, Andréo-Filho N, Gerenutti M, Cintra AC, Giglio JR, Leite GB, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L, Oshima-Franco Y. Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extrats. Phytother Res 2008; 22(6): 784-790.

Eccles, JC, Macfarlane, W.V. Actions of anti-cholinesterase of endplate potencial of frog muscle. J. Neurophysiol 1949; 12:59.

Elmqvist D., Quastel, DMJ. A quantitative study of endplate potentials in human muscle. J. Physiol. 1965; 178: 505-29.

Evans MH, Jaggard PJ. Some effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on the frog neuromuscular junction. Br J Pharmacol 1973; 49(4):651-657.

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

Geron N, Meiri H. The fusogenic substance dimethyl sulfoxide enhances exocytosis in motor nerve endings. Biochim Biophys Acta 1985; 819(2):258-262.

Ginsborg BL, Warriner JN. The isolated chick biventer cervicis nerve muscle preparation. Br J Pharmacol 1960; 15:410-415.

Haque ME, Lentz BR. Influence of gp41 fusion peptide on the kinetics of poly(ethylene glycol)-mediated model membrane fusion. Biochemistry 2002; 41(35):10866-10876.

Haque ME, McCoy AJ, Glenn J, Lee J, Lentz BR. Effects of hemagglutinin fusion peptide on poly(ethylene glycol)-mediated fusion of phosphatidylcholine vesicles. Biochemistry 2001a; 40(47):14243-14251.

Haque ME, McIntosh TJ, Lentz BR. Influence of lipid composition on physical properties and peg-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles: “nature’s own” fusogenic lipid bilayer. Biochemistry 2001b; 40(14):4340-4348.

Harvey, AL, Barfaraz, A, Thosom, E, Faiz, A, Preston, S, Harris, JB. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. Toxicon 1994; 32(3):257-65.

Holland JW, Hui C, Cullis PR, Madden TD. Poly(ethylene glycol)-lipid conjugates regulate the calcium-induced fusion of liposomes composed of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. Biochemistry 1996; 35(8):2618-2624.

Huang SK, Hui SW. Chemical co-treatments and intramembrane particle patching in the poly(ethylene glycol)-induced fusion of turkey and human erythrocytes. Biochim Biophys Acta 1986; 860(3):539-548.

Huang SK, Hui SW. Fluorescence measurements of fusion between human erythrocytes induced by poly(ethylene glycol). Biophys J 1990; 58(5):1109-1117

Krause TL, Bittner GD. Rapid morphological fusion of severed myelinated axons by polyethylene glycol. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87(4):1471-1475.

Kishi M, Itagaki Y, Takakura R, Sudo T, Teranishi M. Effect of polyethylene glycol and dimethyl sulfoxide on the fusion of bovine nuclear transfer using mammary gland epithelial cells. Cloning Stem Cells 2003; 5(1):43-49.

Langeron O, Coirault C, Fratea S, Orliaguet G, Coriat P, Riou B. The effects of dantrolene on the contraction, relaxation, and energetics of the diaphragm muscle. Anesth Analg 1999; 89:466.471.

Lau YF, Brown RL, Arrighi FE. Induction of premature chromosome condensation in CHO cells fused with polyethylene glycol. Exp Cell Res 1977; 110(1):57-61.

Li J. Synthesis of polyethyleneglycols (PEGs): derivatives and applications in biomaterials. BME 2001; 430.

McLarnon JG, Saint Da, Quastel DM. The actions of dimethyl sulfoxide on neuromuscular transmission. Mol Pharmacol 1986; 30(6):631-638.

Maggio B, Ahkong QF, Lucy JA. Poly(ethylene glycol), surface potential and cellfusion. Biochem J 1976; 158(3):647-650.

Massenburg D, Lentz BR. Poly(ethylene glycol)-induced fusion and rupture of dipalmitoylphosphatidylcholine large, unilamellar extruded vesicles. Biochemistry 1993; 32(35):9172-9180.

Mishra RK, Rajeswari MR, Singhal GS. Fusion of phosphatidylcholine liposomes induced by polyethylene glycol. Biochem Int 1988; 16(6):1137-1144.

Miyamoto MD. Binomial analysis of quantal transmitter release at glycerol treated frog neuromuscular junctions. J Physiol. 1975 Aug; 250(1):121-142.

Murakami, MT, Viçoti MM, Abrego JRB, Lourenzoni MR, Cintra ACO, Arrua EZ et al. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues. Toxicon 2007; 49: 378-387.

Norwood TH, Zeigler CJ, Martin GM. Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene glycol-mediated somatic cell fusion. Somatic Cell Genet 1976; 2(3):263-270.

Oshima-Franco Y, Leite GB, Dal Belo CA, Rodrigues-Simioni L. Effects of manganese íons in the neuromuscular junction. Rev Bras Toxicol 2005; 18(1):17-26.

Ribeiro MZ. Extração de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) Universidade de São Paulo 2001; 138 p.

Rodrigues L, Cunha DB, Leite GB, Borja-Oliveira CR, Cintra ACO, Rodrigues-Simioni L, Oshima-Franco Y. Ação da heparina contra a atividade neurotóxica da miotoxina bothropstoxina-I, Saúde Rev 2004; 6(14):19-29.

Rodrigues-Simioni L, Borgese N, Ceccarelli B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience 1983; 10(2):475-489.

Smith CL, Ahkong QF, Fisher D, Lucy JA. Is purified poly(ethylene glycol) able to induce cell fusion? Biochim Biophys Acta 1982; 692(1):109-114.

Stromer M, The R, Hasselback W. The effect of ethylene glycol and DMSO on fusion of isolated sarcoplasmic reticuloum membranes. A Naturforsch [C] 1976; 31(11):708-711.

8- ANEXOS

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **973-1**, sobre **"EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE POLIETILENOGLICOL (PEG) 400 SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR"** sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni / Mário Oshima** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 22 de março de 2006.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **973-1**, entitled **"PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF POLYETHYLENEGLYCOL (PEG) 400 ON NEUROMUSCULAR JUNCTION"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on March 22, 2006.

Campinas, 22 de março de 2006.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3788-6356
E-mail: ceea@cemib.unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm

30-Nov-2008

Dear Prof. Oshima-Franco,

Your manuscript entitled "The influence of polyethylene glycol 400 (PEG) on the neuromuscular junction" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Muscle and Nerve.

Your manuscript number is MUS-08-0645. Please mention this number in all future correspondence regarding this submission.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into http://mc.manuscriptcentral.com/mus . If you have difficulty using this site, please click the 'Get Help Now' link at the top right corner of the site.

Thank you for submitting your manuscript to Muscle and Nerve.

Yours sincerely,

Muscle and Nerve Editorial Office

No virus found in this incoming message.
Checked by AVG - http://www.avg.com
Version: 8.0.176 / Virus Database: 270.9.11/1820 - Release Date: 11/29/2008 6:52 PM

Muscle and Nerve

The influence of polyethylene glycol 400 (PEG) on the neuromuscular junction

Journal:	*Muscle and Nerve*
Manuscript ID:	draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Oshima, Mario; Unicamp, Pharmacology Leite, Gildo; Unicamp, Pharmacology Rostelato-Ferreira, Sandro; Unicamp, Pharmacology; Unicamp, Pharmacology Cruz-Hofling, Maria; Unicamp, Histology and Embriology Rodriques-Simioni, Lea; Unicamp, Pharmacology Oshima-Franco, Yoko; State University of Campinas, Pharmacology; -, -
Keywords:	avian preparation, mammalian preparation, solvents

scholarONE™ Manuscript Central

For Review Only

John Wiley & Sons, Inc.

The influence of polyethylene glycol 400 (PEG) on the neuromuscular junction

[1]Mário Oshima, [1]Gildo Bernardo Leite, [1]Sandro Rostelato-Ferreira, [2]Maria Alice da Cruz-Höfling, [1]Léa Rodrigues-Simioni, [1]Yoko Oshima-Franco

1. Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo State, Brazil.
2. Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo State, Brazil.

Acknowledgments: Fapesp and Faep/Unicamp by financial support.

Running title: PEG, a bioactive solvent.

CORRESPONDENCE TO: YOKO OSHIMA-FRANCO, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6111, 13083-970, Campinas, SP, Brazil (fax +55 19 3521-5933, Email: yofranco@terra.com.br.

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review Only

The influence of polyethylene glycol 400 (PEG) on the neuromuscular junction

Abstract

PEG is widely used as solvent among other applications. An ideal solubilizing does not interfere with the *in vitro* biological system, unless it is a bioactive agent. The pharmacological effects of 3, 20 and 100 µM PEG were investigated on neuromuscular preparations, with no change on the basal response, facilitatory, and paralysis, respectively. Facilitatory effect was not related to an anticholinesterasic action (PEG, n=6), as that demonstrated using neostigmine (12 µM, n=4) in precurarized (d-Tc, 5.8 µM) preparations. A presynaptic action was discarded since quantal content was similar to controls. PEG has been improved the sarcolemmal sensitivity under direct and indirect stimulation, since it is abble in releasing calcium from sarcoplasmic reticulum even when dantrolene (30 µM, n=4) was previously applied. Paralysis at high concentration depolarized membrane, but did not alter the morphological muscle fibers pattern. We concluded that PEG acts on sarcolemmal membrane justifying its use as a drug carrier.

Key words: avian preparation, biventer cervicis, mammalian preparation, phrenic nerve-diaphragm, solvents.

For Peer Review Only

INTRODUCTION

Polyethylene glycols are polymers of ethylene oxide and water and their ethers. They vary in consistency from liquid to solid, depending on the molecular weight, indicated by a number following the name. They are used as surfactants, dispersing agents, solvents, ointment and suppository bases, vehicles, and tablet excipients [17, 23]. Recently, Cintra-Francischinelli et al. [5] exemplify their various applications widely related in the literature, as substrate by molecular biologists to fuse plasma membranes of cells suspended in aqueous medium to repair the cut ends of an invertebrate-myelinated central nervous system axon in the earthworm [20]; as solubilizing agents of plasmid DNA in selected polar organic solvents without using cationic polymers and surfactants [22]; for the gene therapy including DNA vaccine [19], and more recently in the nanotechnology area, including nanomedicine [9], being considered an important compound in biomedical and biomaterial areas.

Among these polymers, polyethylene glycol 400 (PEG 400 or simply PEG in this study) is an excellent solvent for vegetal extracts with high medicinal potential [5], but a search of the literature did not find previously published its influence on bodily fluids and its action on membranes in an animal experimental model. Our purpose was to deep the data available on PEG action- and interaction- with membranes, in mammalian and avian neuromuscular preparations using myographical, electrophysiological and histological techniques.

MATERIALS AND METHODS

Materials

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review Only

Polyethylene glycol 400 (here simply PEG) was from Synth®, dantrolene (sodium salt) was from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), d-Tubocurarine (d-Tc) was from Abbott Laboratories (São Paulo, Brazil) and neostigmine was from Roche (São Paulo, Brazil).

Animals

Male Swiss white mice (26-32 g) were supplied by the Animal Services Unit of the State University of Campinas (UNICAMP). HY-Line W36 male chicks (4–8 days old) were supplied by Granja Globo Aves Agrovícola Ltda (Mogi Mirim, SP, Brazil). The animals were housed at 25 ± 3°C on a 12 h light/dark cycle and had access to food and water *ad libitum*. This project (protocol number 973-1) was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEEA-IB, UNICAMP) and the experiments were done within the guidelines established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

Mouse phrenic nerve-diaphragm muscle (PND) preparation

The diaphragm and its phrenic nerve branch were obtained from mouse anesthetized with halothane inhalation (Cristália, Campinas, Brazil) and sacrificed by exsanguination. The diaphragm was removed according to Bülbring [4], modified for mice, and mounted under a tension of 5 g in a 5 mL organ bath containing Tyrode solution with the following composition (mM): NaCl 137, KCl 2.7, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 0.49, NaH_2PO_4 0.42, $NaHCO_3$ 11.9 and glucose 11.1. After equilibration with the carbogen aeration mixture of 95% O_2/5% CO_2, the pH of this solution was set at 7.0. The preparations were stimulated indirectly with supramaximal stimuli (4 x threshold, 0.1 Hz, 0.2 ms) delivered from a Grass S48 stimulator to the nerve through bipolar

For Peer Review Only

electrodes. Isometric twitch tension was recorded with a force displacement transducer (Load Cell BG-10 GM) coupled to a physiographic (Gould, Model RS 3400) via a Gould universal amplifier. The preparations were allowed to stabilize for at least 20 min before treatments with 3, 20 or 100 μM PEG (n=6, 14, and 8, respectively) or Tyrode solution alone (control, n=6). In some experiments direct stimuli (50 V, 2 ms) was performed in pretreated preparations with d-Tc (5.8 μM).

Chick biventer cervicis muscle preparation (BC)

Chicks were killed by halothane inhalation and biventer cervicis muscles were removed [11] and mounted under a tension of 1g/0.5cm in a 5ml organ bath containing warmed (37ºC), aerated (95% O_2 + 5% CO_2) Krebs solution of the following composition (mM, pH 7.5): NaCl, 118.1; KCl, 4.8; $CaCl_2$, 2.5; $MgSO_4$, 1.2; $NaHCO_3$, 25; and glucose, 11.1. A bipolar platinum ring electrode was inserted around the tendon within which the nerve trunk supplying the muscle runs. Field stimulation was done using a Grass S48 stimulator (0.1Hz, 0.2 ms, 5V). Muscle contractions and contractures were recorded isometrically via a force-displacement transducer (Load Cell BG- 10GM) coupled to a Gould model RS3400 physiograph. Contractures to exogenously applied acetylcholine (ACh, 110 μM, for 60s) and potassium chloride (KCl, 20 mM, for 180s) were recorded in the absence of field stimulation prior to treatment and at the end of the experiment, as a test for the evaluation of pre- or post-synaptic action and, at the same time, over the sarcolemmal integrity. The BC preparations were allowed to stabilize for at least 20 min before the addition of ACh or KCl. Then, the same protocols cited above for PND were carried out, including protocols with dantrolene (30 μM). Control experiments were carried out

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review Only

using Krebs solution. In some experiments direct stimuli (20 V, 2 ms) was performed in pretreated (or no) preparations with d-Tc (5.8 μM), or adding neostigmine (12 μM).

Electrophysiology

End-plate potentials (EPPs) were recorded in mouse hemidiaphragm "cut muscle" [1] using conventional intracellular microelectrode technique [8]. The dissected muscle was mounted in a lucite chamber containing aerated (95% O2, 5% CO2) Tyrode solution (pH 7.4) at 30°C. EPPs were obtained under conditions in which the membrane resting potential were kept, using glass microelectrodes filled with 3M KCl (resistance 10-20 MΩ) inserted into the muscle fiber and the recordings on a Gould RS 3400 were displayed on a Tektronix oscilloscope. The obtained measurements were stored to a computer and the data analysed using AqDados 4 software (Lynx). The quantal content (QC) was calculated taking the values of end-plate potentials, which were firstly corrected for non-linear summation of the quantal components [6, 16] based on the equation EPPc = [(EPPu (RP-RVP)]/RP-RVP-EPPu), where EPPc is the corrected end-plate potential, EPPu is the uncorrected end-plate potential, RP is the resting potential and RVP is the reversal potential of the end-plate potential. The RVP value was taken as -5 mV, which is the usual value for glycerol-treated muscles [18]. In this study, the RVP was not considered since in "cut muscle" preparation this procedure is unnecessary. The quantal content (QC) was estimated as the quotient between the squared average and the variance of the EPPs (indirect method) as described by Oshima-Franco et al. [21].

Histological Analysis

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review Only

After 60 min incubation with Krebs solution, BC preparations were rapidly removed from the bath and fixed in Bouin's fluid for 24–48h; then, tissues were washed three times with aqueous ammonia solution followed by dehydration in ethanol series and embedded in Historesin (Leica). Two-µm thick sections, obtained using a Leica RM 2035 microtome (Leica Instruments Gmbh, Nubloch/Heidelberg, Germany), were stained with 0.5% toluidine blue for examination under light microscopy using an Olympus microscope (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan). The muscle damage extent was qualitatively and quantitatively assessed by counting 70 fibers (normal and damaged) in four non-overlapping areas from a total of 280 fibers per preparation [(2)]. Currently, morphological changes as dark cells, edematous cells, sarcolemma rupture, and ghost cells are considered to quantify the damage, mainly for myonecrosis. This procedure was used for all experiments (control and treated preparations, n=3 preparations/treatment).

Statistical analysis

Each pharmacological protocol was repeated at least four times. The results were expressed as the mean ± S.E.M., as appropriate. Student's t-test and ANOVA (Repeated measures) were used for statistical comparison of the data, using a computational software SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.1.3 Service Pack 3. SAS Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, USA. A value of $p<0.05$ was considered to indicate significance.

RESULTS

Concentration-response curve of PEG on NPD and BC preparations

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review Only

Figure 1 shows the concentration-dependent effects when PEG was added to the bath containing mouse phrenic nerve -diaphragm (1A) or chick biventer cervicis (1B) preparations under indirect stimuli. The minor concentration (3 μM) was not significantly different from Tyrode solution (n=6), but was from Krebs solution (n=7), showing the major sensitivity of chick preparation. The median concentration (20 μM) induced a facilitatory effect (an increase of twitches amplitude), that returned to basal level (as Tyrode control) in mouse preparation (n=14) and it was kept in chick preparation (n=6, *$p<0.05$ compared to control). The maximum concentration studied (100 μM) caused neuromuscular blockade immediately (in mammalian) or gradually (in avian). Although differences exist between preparations they are related to their duration time, and this fact was take in account for the further protocols. Avian preparation allows the analysis of ACh- and KCl-induced contractures as showed in Figure 1C. Note that the exogenous addition of ACh did not alter the response in preparations treated with 3 or 20 μM, but it inhibits the contracture with 100 μL. The exogenous addition of KCl induced statistical differences on the contracture with all concentrations. Note that the median concentration (20 μM) caused an increasing of contracture amplitude, while the maximum concentration (100 μM) was totally affected with ACh addition. In control preparations, contracture induced by ACh and KCl was stable after 60 min indirect stimulation.

Facilitatory effect and neuromuscular blockade of PEG under direct stimulation

The myographic registers of avian preparations directly stimulated and exposed to Krebs solution alone (Fig. 2A, n=6), 20 μM (2B, n=4) and 100 μM (2C, n=8) show the same pattern of response found under indirect stimulation (Fig. 1A). The neuromuscular blockade with 100 μM

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review Only

was accompanied by an important contracture. Measures considering 50% of paralysis were 23 ± 4.3 min (direct stimuli, n=8) and 15 ± 1.4 min (indirect stimuli, n=6), with no significant difference between them.

The nicotinic receptor was protected in further experiments using d-Tc (5.8 µM). Under indirect stimuli a rapid neuromuscular blockade was viewed, that confirms the antagonism-induced by d-Tc against ACh. Changing the voltage condition and stimulating directly during 60 min, the muscular contraction can be registered, as seen in Figure 3A (PND, Tyrode control, n=3) and 3C (BC, Krebs control, n=3). However, contrary to 20 µM PEG, concentrations of 100 µM (n=6 each) lead to a neuromuscular blockade slightly reversible in PND (3B), but not in BC (3D), which also lead to an intense contracture.

Action of PEG on acetylcholinesterase enzyme

The addition of neostigmine (12 µM) on previously curarized BC preparations is a typical procedure for investigating the anticholinesterasic action of determined substantance. Figure 4 shows myographic registers of Krebs control (A, n=6); neostigmine addition in time (min) zero followed by an immediate recovery of twitches (B, n=4); and 20 µM PEG addition in time (min) zero with no consequence on the acetylcholinesterase enzyme (C, n=6).

Action of PEG on skeletal muscle

Dantrolene acts directly on skeletal muscle by interfering with release of calcium ion from the sarcoplasmic reticulum, causing um neuromuscular blockade as seen in Figure 5A and

For Peer Review Only

5B. At 30 min, 20 μM PEG (n=4) was added to the bath containing BC preparation, with immediate recovery of twitches and interruption of dantrolene action.

Electrophysiology contribution

The membrane resting potentials of PEG were obtained, with a slight and strong significant difference, respectively for 20 (n=4) and 100 (n=4) μM, when compared to control (Fig. 6A, n=4). The high membrane depolarization avoids the end plate potential measure, and lower concentrations as 10 μM were used in order to obtain these potentials. Fig. 6B shows the quantal content calculated at zero (Tyrode control), 15, 30, 45 and 60 min, with no significant difference from controls.

Histological analysis

Panel 7A shows chick BC preparations incubated with Krebs solution alone (control) presenting normal muscle morphology, regular muscle fiber fascicles and uniform intensity of cells staining. The fibers cross-sections showed regular arrangement of the cross-sectional myofibril bundles. The muscles incubated with 3 (Panel 7B), 20 (Panel 7C), and 100 (Panel 7D) μM PEG presented the same characteristic as those incubated with Krebs solution only. Changes were mainly related to fibers that were darker and therefore provided poor visualization of cross-sectioned myofibril bundles. The percentages of affected fibers in preparations (n=3 each) incubated with Krebs solution (3.6±0.5%), 3 μM (2±0.6%), 20 μM (5.2±0.6%), and 100 μM (4.3 ± 0.6%) were not significantly different.

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review Only

DISCUSSION

The various applications of polyethylene glycols were mentioned in the introduction section. The focus of this work is to deep on the possible action and/or interactions of PEG on animal models since its internal use for humans, as that seen in PEGylation of drugs [25], is a real concern. PEGylation is a popular technique to address properties of prolonged half-life, higher stability, water solubility, lower immunogenicity and antigenicity, as well as potential for specific cell targeting [24].

The mode by which PEG acts in respect of site-specific chemistry and influence of molecular weights is yet unclear. Using mammalian and avian neuromuscular preparations, and by association of three techniques, some interesting results were found in this study. A parallel finding in the literature is the work of Geron and Meiri [10], who attribute to dimethyl sulfoxide (DMSO) and polyethylene glycol (PEG) a fusogenic property. Fusion of synaptic vesicles with the surface membrane of the nerve terminal is a key step in synaptic transmission, which normally requires the entry of calcium ions into the cell.

Basically, three hypotheses were considered in the conduction of this study: presynaptic, cleft synaptic, post-synaptic (involving nicotinic receptor or muscle skeletal) actions for PEG 400. Firstly, concentration-dependent pharmacological effects as none or little, facilitatory (increase of twitches amplitude) or neuromuscular blockade were common in both preparations used, mouse phrenic nerve-diaphragm and chick biventer cervicis, differing only in the duration effect.

For Peer Review Only

A possible presynaptic nature of PEG was not confirmed by electrophysiological technique. It was expected an alteration in the neurotransmitter release due a possible fusogenic property, as mentioned by Geron and Meiry [10], but it can be related to the molecular weight [15, 26], 8000 used by those authors and 400 used in this study.

The facilitatory effect reported in this study suggests that PEG is able to activate ryanodine receptors at sarcoplasmic reticulum, and not by an anticholinesterasic action nor via nicotinic receptors. Clearly, PEG causes an increase of contractile response in both direct and indirectly stimulated preparations. The resting potentials obtained from electrophysiology show a slight depolarization at 20 µM PEG, also confirmed by exogenous KCl addition to the bath containing the biventer cervicis preparation, that in turn can be a consequence of solubilization on sarcolemmal, but not in axolemmal, until reaching the sarcoplasmic reticulum. These results taken together can introduce new principles of escalating strategies for Myasthenia gravis, a prototype antibody-mediated neurological autoimmune disorder [12], or against paralysis-induced by botulinum toxin in detriment of existence of innovator purposes in literature [14], or tetrodotoxin (TTX) envenomation, since TTX is known to block nerve conduction but have no effect on the release of transmitter from presynaptic terminals [7, 13], besides other possibilities.

The blocker effect of PEG seems be related to an excessive concentration (100 µM) saturating the medium nutritive than any pharmacological effect like that induced by muscle relaxants [3]. In behalf of this, although electrophysiologic data point out to membrane depolarization, our histological analysis showed no significant morphological changes, while the contracture face to exogenous ACh and KCl addition into the bath containing biventer cervicis preparations were equally blocked. As ACh receptor is not involved in facilitatory effect at

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review Only

medium concentration (20 μM) is prudent discard it than to assume a role for PEG as neuroblocker agent.

Finally, the fact of PEG (polyethylene glycol 400) acting on sarcolemmal constitutes a safe margin and justify its use as drug carrier, since no cell damage was seen through histological analyses. Besides, this study showed that much more than a simple solvent PEG is a bioactive molecule endowed of pharmacological action.

Abbreviations

ACh - acethylcholine

BC - biventer cervicis

d-Tc – d-Tubocurarine

DMSO – dimethyl sulfoxide

KCl – potassium chloride

PND – phrenic nerve-diaphragm

PEG – polyethylene glycol 400

QC – quantal content

TTX -= tetrodotoxin

References

1. Barstad JA, Lilleheil G. Transversaly cut diaphragm preparation from rat. An adjuvant tool in the study of the physiology and pharmacology of the myoneural junction. Arch Int Pharmacodyn Ther 1968; 175:373-390.

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review Only

2. Bueno LGF, Leite GB, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L, Oshima-Franco Y. Effects of manganese (Mn^{2+}) on neurotoxic and myotoxic activities induced by *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms in chick biventer cervicis preparations. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2007; 13:479-499.

3. Braga AAA, Barcelos CC, Braga FSS, Fernandes SCA, Franco YO, Mantovani M, et al. Phenobarbital influence on neuromuscular block produced by rocuronium in rats. Acta Cir Bras 2008; 23:343-347.

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

5. Cintra-Francischinelli M, Silva MG, Andréo-Filho N, Cintra ACO, Leite GB, Cruz-Höfling MA, et al. Effects of commonly used solubilizing agents on a model nerve-muscle synapse. Lat Am J Pharm 2008; 27:721-726.

6. Elmqvist D, Quastel DMJ. A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. J Physiol 1965; 178: 505–529.

7. Evans MH. Tetrodotoxin, saxitoxin, and related substances: their applications in neurobiology. Int Rev Neurobiology 1972; 15:83-166.

8. Fatt P, Katz B. An analysis of the end-plate potential with an intracellular electrode. J Physiol 1951; 115:320-370.

9. Ganta C, Shi A, Battina SK, Pyle M, Rana S, Hua DH, et al. Combination of nanogel polyethylene glycol-polyethylenimine and 6(hydroxymethyl)-1-4-anthracenedione as an anticancer nanomedicine. JH Nanosci Nanotechnol 2008; 8:2334-2340.

For Peer Review Only

10. Geron N, Meiri H. The fusogenic substance dimethylsulfoxide enhances exocytosis in motor nerve endings. Biochim Biophys Acta 1985; 819:258-262.

11. Ginsborg BL, Warriner J. Isolated chick biventer cervicis-nerve muscle preparation. Br J Pharmacol 1960; 15:410-411.

12. Gold R, Schneider-Gold C. Current and future standards in treatments of Myasthenia gravis. Neurotherapeutics 2008; 5:535-541.

13. Gong JP, Gwee MCE, Gopalakrishnakone P. *Buthus martensi karsch* venom: prejunctional adrenergic activity in the rat isolated anococcygeus muscle. Toxicon 1995; 33:1133-1139.

14. Kumaran D, Rawat R, Ahmed SA, Swaminathan S. Substrate binding mode and its implication on drug design for botulinum neurotoxin A. PLoS Pathog 2008; 4:e1000165.

15. Lee S, Spencer ND. Adsorption properties of poly(l-lysine)-graft-poly(ethylene glycol) (PLL-g-PEG) at a hydrophobic interface: influence of tribological stress, pH, salt concentration, and polymer molecular weight. Langmuir 2008; 24:9479-9488.

16. Martin AR. A further study of the statistical composition of the end-plate potential. J Physiol 1955; 130:114–122.

17. MeSH – Medical Subject Heandings. *Polyethylene glycol.* Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=mesh>, Pubmed, 25 June 2008.

18. Miyamoto, M.: Binomial analysis of quantal transmitter release at glycerol treated frog neuromuscular junction. J Physiol 1975; 250:121–142.

For Peer Review Only

19. Mok H, Park JW, Park TG. Enhanced intracellular delivery of quantum dot and adenovirus nanoparticles triggered by acidic pH via surface charge reversal. Bioconjug Chem 2008; 19:797-801.

20. O'Lague PH, Huttner SL. Physiological and morphological studies of rat pheochromocytoma cells (PC12) chemically fused and grown in culture. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:1701-1705.

21. Oshima-Franco Y, Leite GB, Dal Belo CA, Hyslop S, Prado-Franceschi J, Cintra ACO et al. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004; 95:175-182.

22. Pestel S, Martin HJ, Maier GM, Guth B. Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal, and liver function in rats. J Pharmacol Toxicol Methods 2006; 54:200-214.

23. Ren X, Mao X, Si L, Cao L, Xiong H, Qiu J, et al. Pharmaceutical excipients inhibit cytochrome P450 activity in cell free systems and after systemic administration. Eur J Pharm Biopharm 2008; 70:279-288.

24. Ryan SM, Mantovani G, Wang X, Haddleton DM, Brayden DJ. Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects. Expert Opin Drug Deliv 2008; 5:371-383.

25. Zhang G, Han B, Lin X, Wu X, Yan H. Modification of antimicrobial peptide with low molar mass poly(ethylene glycol). J Biochem 2008a; ("to be published").

For Peer Review Only

26. Zhang X, Pan SR, Hu HM, Wu GF, Feng M, Zhang W, et al. Poly(ethylene glycol)-block-polyethylenemine copolymers as carriers for gene delivery: effects of PEG molecular weight and PEGylation degree. J Biomed Mater Res A 2008b; 84:795-803.

For Peer Review Only

Legends

Fig. 1. PEG concentration-response curve on mouse phrenic nerve-diaphragm (A) and chick biventer cervicis (B and C) preparations. None or little, facilitatory or paralysis effects are showed using 3, 20 or 100 µM PEG, respectively. Note that the duration is different between them, mainly at 20 µM PEG. The points are the means ± SEM of 6-14 experiments. The contracture face to exogenous ACh and KCl addition is showed in C, where the symbol Δ means no response face to ACh and KCl addition. *$p<0.05$ compared to controls.

Fig. 2. Biventer cervicis preparations (direct stimuli). The representative register of preparations exposed during 60 min to Krebs solution (A, n=6) or to PEG 20 µM (B, n=4) or 100 µM (C, n=8) illustrates the facilitatory and blocker effects of PEG, respectively. Note the intense contracture at the major (100 µM PEG), but not with the minor (20 µM PEG) concentration.

Fig. 3. Myographical registers representative of mammalian (A, B) and avian (C, D) preparations pretreated with d-Tc (5.8 µM) and visualized by the neuromuscular blockade under indirect stimuli. A and C are the controls of Tyrode (n=3) and Krebs (n=3) solutions, respectively. All zero time means the experimental start under direct stimuli. B and C are the treatment with 100 µM PEG (n=6 each) leading to paralysis of twitches. Δ, KCl addition. □, ACh addition.

Fig. 4. Myographical registers representative of avian preparations previously curarized (d-Tc 5.8 µM) and maintained under indirect stimuli. Fig. 4A shows a curarized preparation with no addition at zero time (control, n=6). Fig. 4B shows neostigmine addition (12 µM, n= 4) at zero time and immediate recovery of twitches. Note also the recovery of the nicotinic receptor when ACh was added at the end of experiment. When 20 µM PEG was added to precurarized preparations no effect was registered (Fig. 4C, n=6). Δ, KCl addition. □, ACh addition.

Fig. 5. Biventer cervicis preparation (indirect stimuli). The paralysis induced by dantrolene (D, 30 µM) and immediate recovery induced when 20 µM PEG was adde to the bath at 30 min is showed in 5A. Arrows, dantrolene or PEG addition or washing (w) of preparations. The myographical register is showed in 5B.

Fig. 6. Electrophysiological data obtained from "cut muscle" mouse phrenic nerve-diaphragm. The membrane resting potential were measured (A) face to 20 and 100 µM PEG exposition during zero, 15, 30, 45 and 60 min. The points are the means ± SEM. of 4 experiments. *$p<0.05$ related to control. The quantal content variation is showed in B and no statistically significant difference related to control was found.

Fig. 7. (A) Normal histological appearance (control of chick biventer cervicis preparation, transversal section) presenting normal muscle morphology, regular muscle fiber fascicles and uniform intensity of cells staining. Note that 3 (Panel 7B), 20 (Panel 7C), and 100 (Panel 7D) µM PEG presented the same characteristic as those incubated with Krebs solution only. Changes between them are not significantly different. Bars = 20 µm.

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review Only

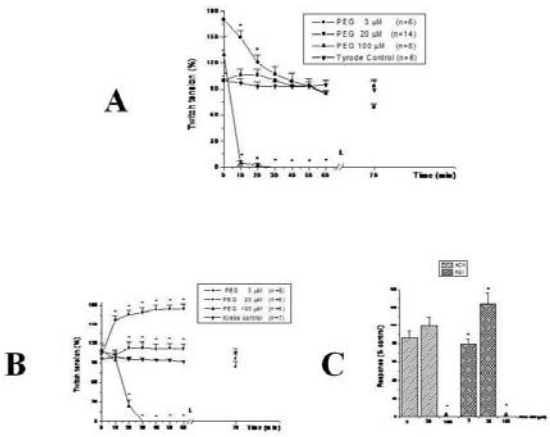


Fig. 1. PEG concentration-response curve on mouse phrenic nerve-diaphragm (A) and chick biventer cervicis (B and C) preparations. None or little, facilitatory or paralysis effects are showed using 3, 20 or 100 µM PEG, respectively. Note that the duration is different between them, mainly at 20 µM PEG. The points are the means ± SEM of 6-14 experiments. The contracture face to exogenous ACh and KCl addition is showed in C, where the symbol Δ means no response face to ACh and KCl addition. *p<0.05 compared to controls.
254x190mm (96 x 96 DPI)

For Peer Review Only

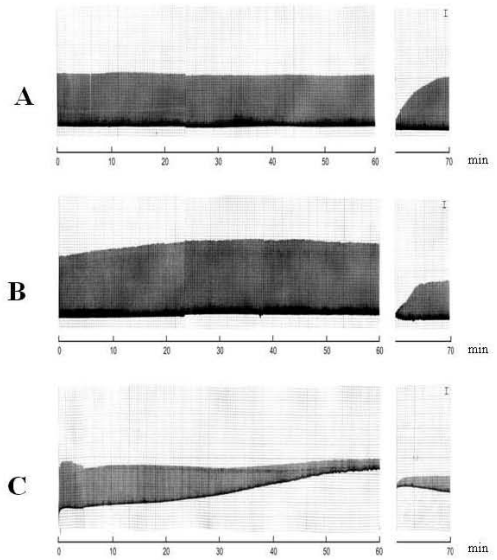


Fig. 2. Biventer cervicis preparations (direct stimuli). The representative register of preparations exposed during 60 min to Krebs solution (A, n=6) or to PEG 20 µM (B, n=4) or 100 µM (C, n=8) illustrates the facilitatory and blocker effects of PEG, respectively. Note the intense contracture at the major (100 µM PEG), but not with the minor (20 µM PEG) concentration.
190x254mm (96 x 96 DPI)

John Wiley & Sons, Inc.

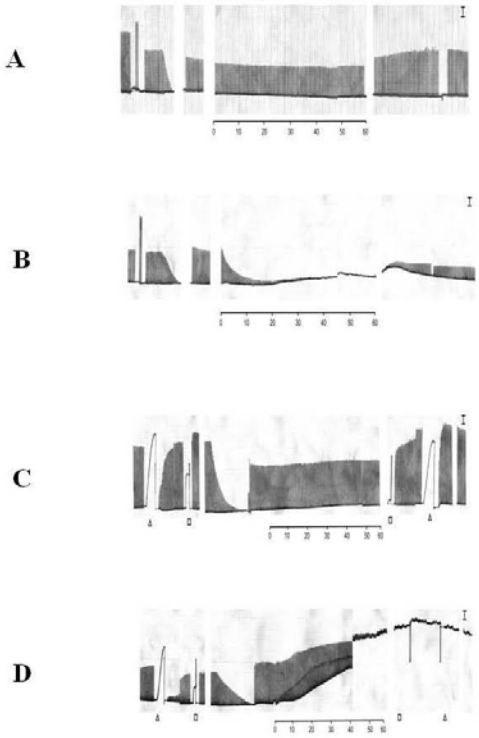


Fig. 3. Myographical registers representative of mammalian (A, B) and avian (C, D) preparations pretreated with d-Tc (5.8 µM) and visualized by the neuromuscular blockade under indirect stimuli. A and C are the controls of Tyrode (n=3) and Krebs (n=3) solutions, respectively. All zero time means the experimental start under direct stimuli. B and C are the treatment with 100 µM PEG (n=6 each) leading to paralysis of twitches. Δ, KCl addition. □, ACh addition.
190x254mm (96 x 96 DPI)

John Wiley & Sons, Inc.

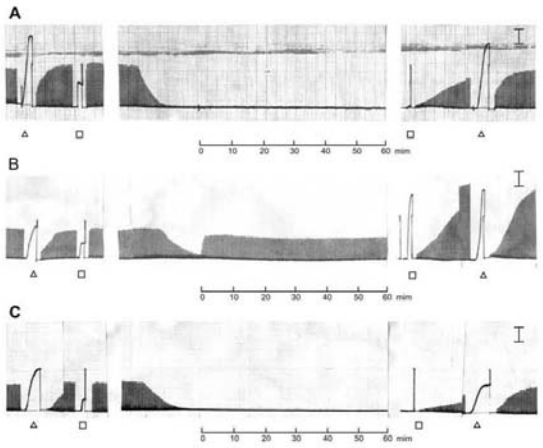


Fig. 4. Myographical registers representative of avian preparations previously curarized (d-Tc 5.8 μM) and maintained under indirect stimuli. Fig. 4A shows a curarized preparation with no addition at zero time (control, n=6). Fig. 4B shows neostigmine addition (12 μM, n= 4) at zero time and immediate recovery of twitches. Note also the recovery of the nicotinic receptor when ACh was added at the end of experiment. When 20 μM PEG was added to precurarized preparations no effect was registered (Fig. 4C, n=6). Δ, KCl addition. □, ACh addition.
254x190mm (96 x 96 DPI)

Only

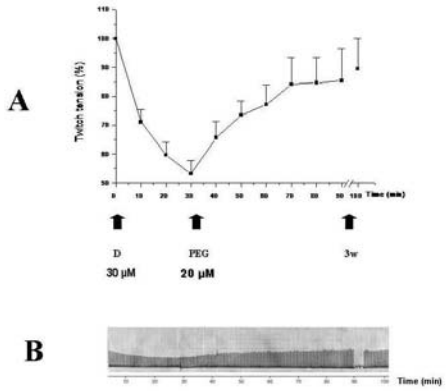


Fig. 5. Biventer cervicis preparation (indirect stimuli). The paralysis induced by dantrolene (D, 30 µM) and immediate recovery induced when 20 µM PEG was adde to the bath at 30 min is showed in 5A. Arrows, dantrolene or PEG addition or washing (w) of preparations. The myographical register is showed in 5B.
254x190mm (96 x 96 DPI)

For Review Only

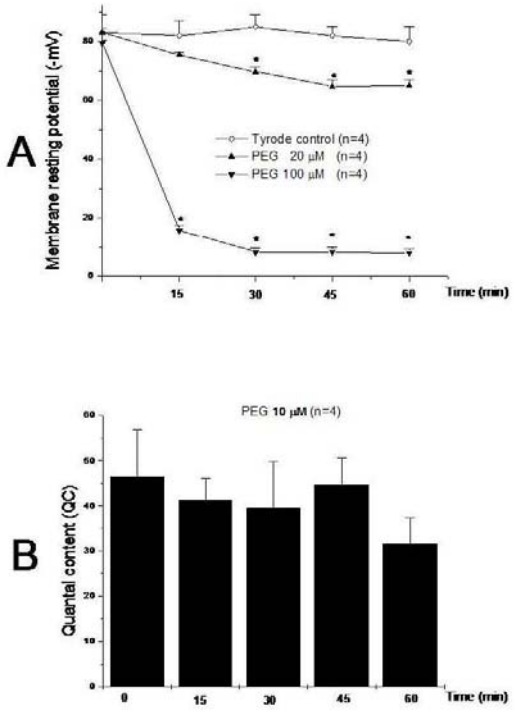


Fig. 6. Electrophysiological data obtained from □cut muscle□ mouse phrenic nerve-diaphragm. The membrane resting potential were measured (A) face to 20 and 100 µM PEG exposition during zero, 15, 30, 45 and 60 min. The points are the means ± SEM. of 4 experiments. *p<0.05 related to control. The quantal content variation is showed in B and no statistically significant difference related to control was found.

John Wiley & Sons, Inc.

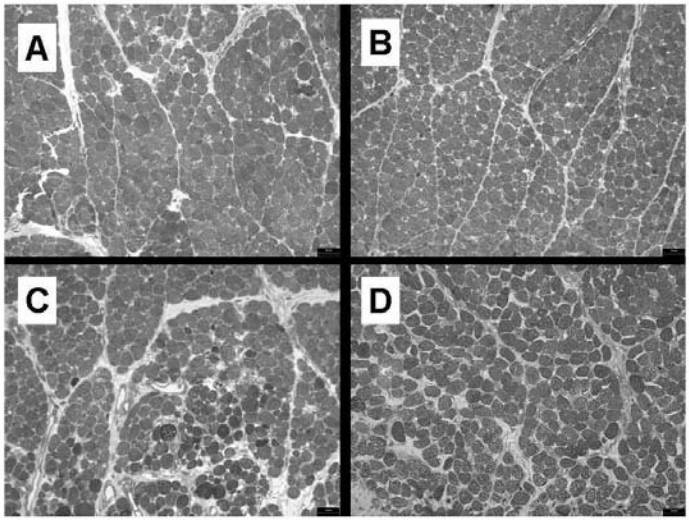


Fig. 7. (A) Normal histological appearance (control of chick biventer cervicis preparation, transversal section) presenting normal muscle morphology, regular muscle fiber fascicles and uniform intensity of cells staining. Note that 3 (Panel 7B), 20 (Panel 7C), and 100 (Panel 7D) μM PEG presented the same characteristic as those incubated with Krebs solution only. Changes between them are not significantly different. Bars = 20 μm.
254x190mm (96 x 96 DPI)

For Peer Review Only

Correção ortográfica
e Edição
-2009-