

VI SEMINÁRIO

Tema: RECEPTORES DE ACETILCOLINA E PATOLOGIAS ASSOCIADAS

Subtemas:

- Propagação de impulso nervoso
- Transmissão de impulso nervoso na junção neuromuscular
- Receptores e resposta neuromuscular
- Aspectos fisiopatológicos da transmissão neuromuscular
- Miastenia Gravis

Intervenientes

- Docentes Convidados
 - Dr. Fernando Morgado (Interno Graduado, Serviço de Neurologia/HSM)
 - Dr. Alexandre Mendonça (Centro de Estudos Egas Moniz, FML)
 - Docentes do Instituto de Bioquímica/ FML
 - Dra. Manuela Nunes (Assistente Estagiária)
 - Dr. João P. Guimarães (Monitor do Instituto de Bioquímica e Interno do Internato Geral/HSM)
 - Alunos, monitores voluntários do Instituto de Bioquímica/FML
 - Gabriela Pereira (Aluna do 4.º ano)
 - Maria João Gomes (Aluna do 4.º ano)
-

PROPAGAÇÃO DO IMPULSO NERVOSO

Gabriela Pereira

Maria João Gomes

Os potenciais eléctricos existem nas membranas de praticamente todas as células do organismo.

Algumas células, como os neurónios (Fig. 1) e as células musculares, são “excitáveis”, i.e., capazes de gerarem impulsos electroquímicos e de os conduzirem.

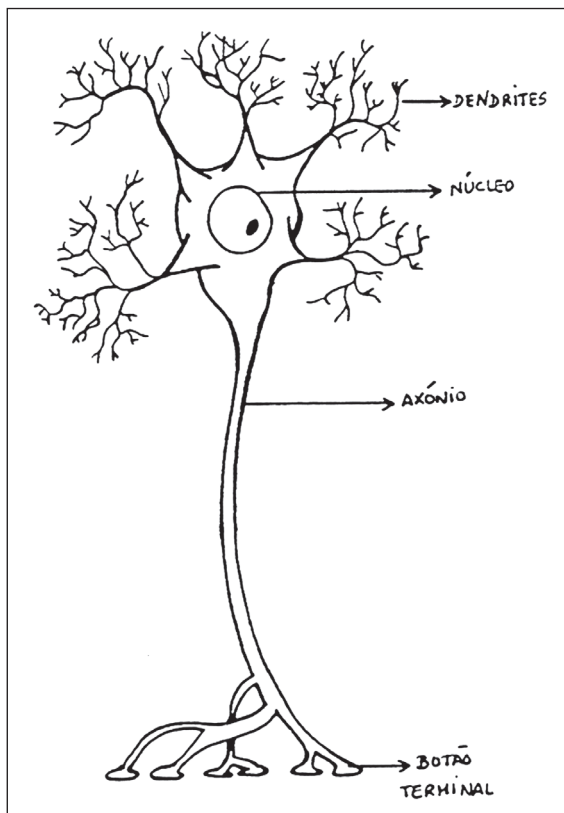


Fig. 1 – Neurónio (representação esquemática)

A transmissão do impulso nervoso é um fenómeno bioquímico que se passa ao nível de membranas celulares com permeabilidade selectiva, de tal forma que se criam gradientes de concentração e gradientes eléctricos. Em repouso, estes gradientes são mantidos por bombas electrogénicas.

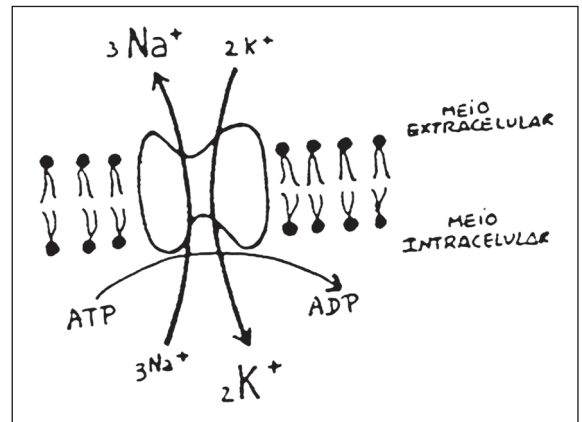


Fig. 2 – Na^+/K^+ ATPase

A bomba de sódio-potássio (Fig. 2), ao transportar estes iões contra o seu gradiente, torna o meio interior negativo em relação ao meio exterior, gerando potencial de repouso.

As células nervosas e musculares, quando excitadas por um estímulo mecânico, eléctrico ou químico, modificam o seu potencial de membrana e rapidamente despolarizam-se, invertendo o potencial. Isto ocorre porque, à medida que a célula se despolariza, abrem os canais iónicos (dependentes de voltagem ou dependentes da ligação a substâncias químicas) e a despolarização, inicialmente local, propaga-se ao longo de toda a membrana celular. Diz-se então que foi gerado um potencial de acção.

Após propagação ao longo da fibra nervosa, o impulso atinge uma estrutura especializada – a sinapse – que é constituída pela terminação nervosa (elemento pré-sináptico) e pela membrana da célula que recebe o novo estímulo (elemento pós-sináptico), separadas entre si por um espaço, a fenda sináptica (Fig. 3).

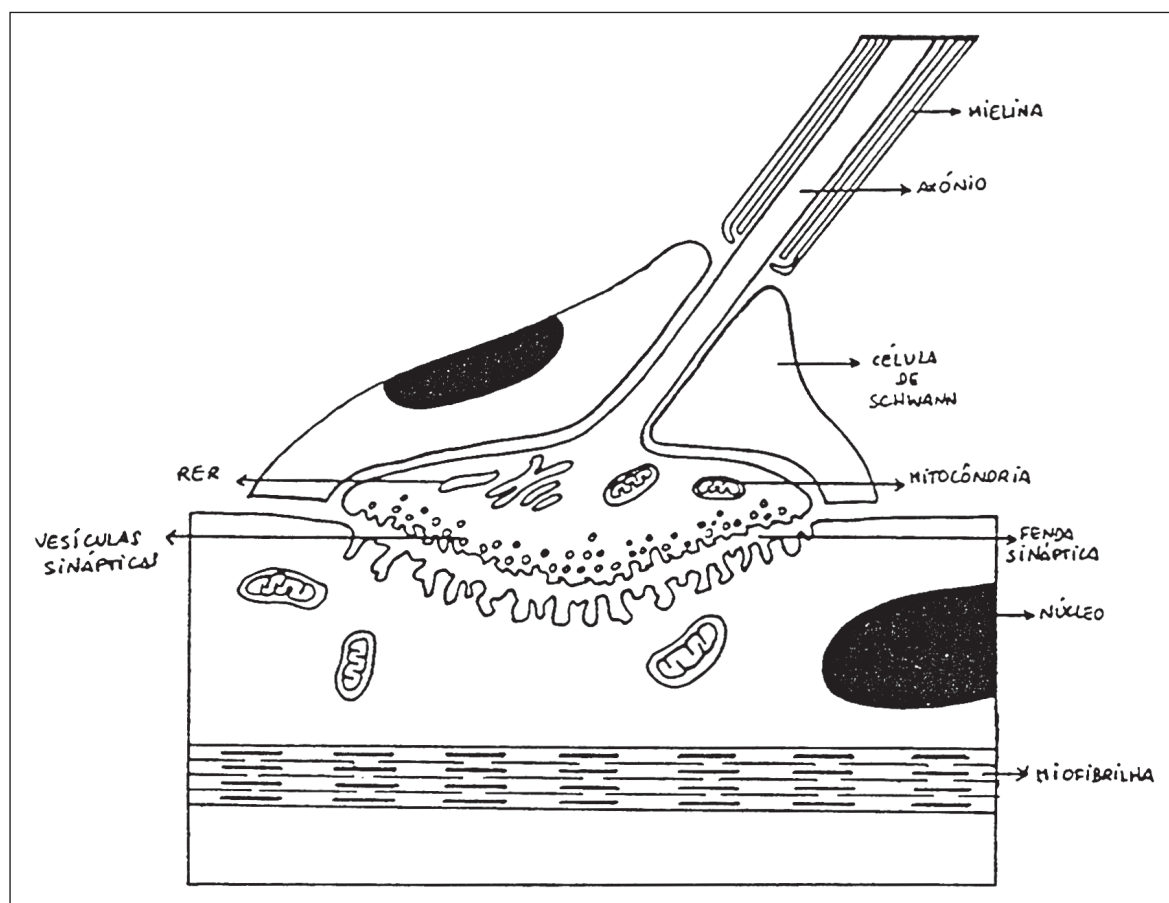


Fig. 3 – Junção neuromuscular

TRANSMISSÃO DO IMPULSO NERVOSO NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

Maria Manuela Nunes

O impulso nervoso propaga-se através das fibras nervosas por meio de trocas iónicas que se processam ao longo da célula, a diferentes velocidades.

A amplitude dos sinais que atravessam o axónio é fixa e as alterações na actividade dos neurónios são o reflexo de modificações na frequência dos impulsos.

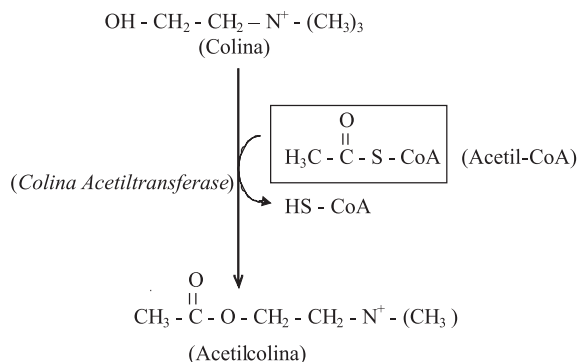
Em 1970 eram conhecidas apenas dez substâncias como estando envolvidas na transmissão química (acetilcolina, alguns aminoácidos e monoaminas). Actualmente este número excede

cinquenta, com a descoberta nas células nervosas de numerosos péptidos com função potencial de mensageiros químicos.

A transferência da informação ocorre entre neurónios e o órgão efector por meio de junções especializadas, denominadas sinapses. O estímulo ultrapassa a fenda sináptica por mediação química, com substâncias denominadas neurotransmissores.

Os neurotransmissores são moléculas formadas no interior do neurónio e armazenadas em vesículas localizadas próximo das terminações do axónio. O número de moléculas do neurotransmissor libertado é função da quantidade presente na terminação nervosa e da frequência de impulsos que atingem a zona terminal.

A acetilcolina é uma das substâncias neurotransmissoras presente nas terminações dos nervos simpáticos ou parassimpáticos. A acetilcolina é sintetizada no axoplasma das terminações nervosas das fibras colinérgicas, segundo a seguinte reacção:



Processo de Transmissão Sináptica

Katz (1966) estabeleceu os passos fundamentais da transmissão química a nível da junção neuromuscular, os quais são comuns para todas as sinapses.

O potencial de acção que se propaga ao longo do axónio despolariza o terminal pré-sináptico, originando a abertura de canais de cálcio e a entrada destes iões no terminal, com libertação subsequente do mediador químico na fenda sináptica, por exocitose.

O cálcio desempenha um papel crucial na transmissão sináptica e os mecanismos que controlam o cálcio livre estão ligados às vias metabólicas celulares.

Quando as moléculas de neurotransmissor se ligam ao receptor na membrana pós-sináptica inicia-se o processo de transdução do sinal que conduzirá a uma resposta do órgão efector.

O mecanismo de funcionamento do receptor baseia-se numa primeira ligação da substância neurotransmissora ao receptor, causando modificações na estrutura molecular da unidade proteica. Uma vez que o receptor é parte integrante da

membrana, uma alteração de estrutura induz aumento da permeabilidade da membrana a diferentes iões: por um lado, um rápido influxo de iões Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} e, por outro, o efluxo de iões potássio. Os canais iónicos formados são chamados “independentes de voltagem” ou “insensíveis à voltagem”.

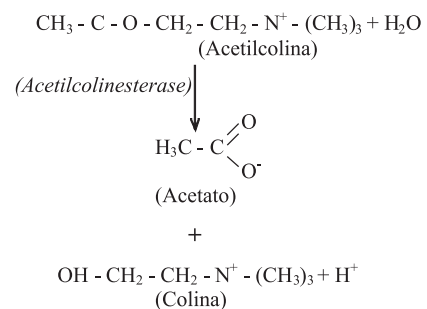
As alterações de carga que modificam o potencial de membrana podem corresponder a potenciais de acção (como ocorre no músculo esquelético). Os iões podem também exercer efeito directo sobre as células receptoras, como seja o caso do efeito dos iões cálcio na contracção do músculo esquelético.

Se o potencial de membrana se mover na mesma direcção do potencial de acção, a acção sináptica é designada “excitatória”. Se o potencial de membrana for contrário, a acção é “inibitória”.

A transmissão sináptica envolve o movimento contínuo de iões e de mensageiros químicos entre o corpo celular e o terminal (pré-sináptico, sináptico e pós-sináptico).

Acetilcolinesterase

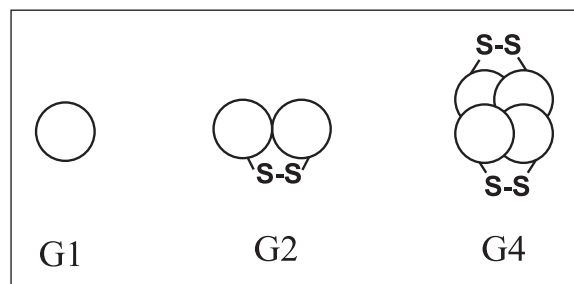
Um processo de remover o neurotransmissor é promover a sua clivagem química. A acetilcolina, neurotransmissor do sistema nervoso autónomo, é cataliticamente hidrolisada em colina e acetato pela acetilcolinesterase (AChE), enzima presente nas terminações nervosas e na superfície dos órgãos receptores. A reacção de hidrólise pode ser esquematizada da seguinte maneira:



A colina que se forma na reacção de hidrólise é recaptada pelas terminações nervosas, sendo reutilizada na síntese de acetilcolina.

A acetilcolinesterase, enzima hidrolítica do grupo das esterases, apresenta acção catalítica do tipo ácido-base. O mecanismo de acção pode ser descrito em duas fases: (i) a acetilcolina reage com um resíduo específico de serina localizado no centro catalítico da acetilcolinesterase, formando-se um intermediário acetilado e liberta-se simultaneamente uma molécula de colina; (ii) a enzima acilada reage com a água, de que resulta um ião acetato e a molécula de acetilcolinesterase livre.

A acetilcolinesterase é uma glicoproteína descrita como estando presente em diferentes espécies associada às membranas excitáveis. São conhecidas diferentes formas moleculares em que estão presentes um, dois ou quatro monómeros globulares, designados respectivamente por G_1 , G_2 , e G_4 (Fig. 4).



G_1 – forma monomérica, G_2 – forma dimérica, G_4 – forma tetramérica.

Fig. 4 – Representação esquemática de diferentes formas globulares da AChE.

Existem nos tecidos excitáveis de algumas espécies formas de associação dos tetrâmeros que apresentam uma “cauda” e são classificadas como formas assimétricas A_4 , A_8 e A_{12} (dependendo do número de tetrâmeros presentes).

A forma molecular de AChE mais abundante no cérebro e sistema nervoso autónomo dos mamíferos é a G_4 (4 monómeros globulares estabilizados por forças de Van der Waals). Nos mamífe-

ros surgem todas as formas moleculares de acetilcolinesterase sendo, no entanto, de considerar variações referentes aos diferentes tipos de fibras musculares. Nos nervos motores do Homem existem formas moleculares do tipo A_{12} (Fig. 5).

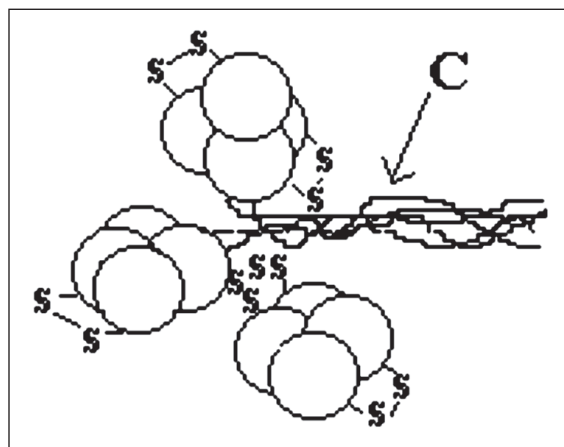


Fig. 5 – Representação esquemática da forma assimétrica da acetilcolinesterase. As unidades globulares encontram-se ligadas a uma “cauda” de colagénio (C).

A acetilcolinesterase revela especificidade para a acetilcolina e apresenta inibição pelo substrato. A actividade enzimática da acetilcolinesterase pode ser influenciada por diferentes moléculas ou iões, com variações individuais relativamente às várias formas que apresenta. Substâncias como a fisostigmina, neostigmina, gás de mostarda ou insecticidas organofosforados, ao inibirem irreversivelmente a actividade da acetilcolinesterase, provocam intoxicação por acumulação de acetilcolina.

RECEPTORES E RESPOSTA NEUROMUSCULAR

Alexandre Mendonça

O conhecimento da morfologia e da fisiologia da junção neuromuscular é fundamental na compreensão de diversas entidades clínicas neurológicas. Além disso, o estudo da junção neuromuscular tem fornecido importante informação acerca

da natureza da transmissão em geral, com relevância para o funcionamento do sistema nervoso central.

Consideremos os passos mais importantes na transmissão neuromuscular, abordando a forma como a sua perturbação está envolvida em algumas entidades clínicas.

Síntese de Neurotransmissor e seu armazenamento em Vesículas Pré-sinápticas

A acetilcolina é formada nas terminações nervosas a partir da colina e do acetil-CoA, por acção da enzima colina-acetiltransferase, sendo transportada e concentrada em vesículas pré-sinápticas. Este processo parece estar alterado numa das formas de miastenia congénita.

Libertação de Neurotransmissor

A libertação da acetilcolina é um processo dependente da presença de cálcio extracelular, e da sua entrada na célula através de canais de cálcio dependentes da voltagem. No síndrome miasténico de Eaton-Lambert, mais frequentemente causado pelo carcinoma do pulmão, a existência de anticorpos IgG altera a estrutura e a função destes canais de cálcio, diminuindo a libertação de neurotransmissor. Também no botulismo, a existência da toxina botulínica, produzida pelo *Clostridium botulinum*, e quase sempre ingerida em alimentos contaminados, interfere de uma forma não totalmente esclarecida com a libertação de neurotransmissor.

Ligação de Neurotransmissor aos Receptores Pós-sinápticos

A acetilcolina libertada difunde na fenda sináptica e liga-se aos receptores colinérgicos nicotínicos (AChR) pós-sinápticos, induzindo altera-

ções de conformação do receptor, abertura de canal iónico, e despolarização da membrana pós-sináptica, constituindo o potencial de placa motora. A *Miastenia Gravis* é uma doença relativamente frequente, em que existem alterações estruturais da região pós-sináptica e diminuição do número de AChR pós-sinápticos. Na maioria dos casos, estas alterações estão em relação com a presença de anticorpos anti-AChR. Está descrita uma forma de miastenia congénita em que o defeito parece ser ao nível dos canais de iões activados pela acetilcolina, com aumento do tempo de abertura destes canais.

Inactivação de Neurotransmissor

A acetilcolina é hidrolisada na fenda sináptica por acção da acetilcolinesterase. A intoxicação com organofosforados induz manifestações clínicas colinérgicas muito graves, por inibição irreversível da acetilcolinesterase. Existe também uma forma de miastenia congénita por défice de acetilcolinesterase.

ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR

João Paulo Guimarães

O processo de transmissão dos estímulos nervosos até às fibras musculares é complexo. O bom funcionamento de todo o sistema implica que todos os fenómenos atrás descritos ocorram sequencial e coordenadamente. Daí que qualquer alteração (por pequena que seja) de um dos componentes provoque a falha do sistema e cause perturbações mais ou menos graves em todo o processo.

Grosso modo, as alterações podem-se classificar como sendo ao nível da fenda sináptica, ou pré ou pós-sinápticas (consoante a localização pré ou pós-sináptica do defeito), permanentes ou transitórias, ou ainda com base na origem (que pode, por exemplo, ser química ou imunológica, entre outras causas).

Causas Pré-Sinápticas

Correspondem a alterações que levam à falha de libertação do mediador. Podem ter origem, por exemplo, em defeitos no revestimento de mielina dos neurónios causado por degenerescência, que ocorre com frequência em conjunto com destruição das terminações dos nervos motores.

Um outro tipo de alterações possíveis pode ser causado por (i) medicamentos que dificultam ou impedem a libertação das vesículas de acetilcolina para a fenda sináptica (por exemplo: fenitoína, clorpromazina, ou antibióticos, tais como a clindamicina, lincomicina, neomicina, estreptomicina ou kanamicina), (ii) toxinas libertadas por bactérias como o *Clostridium botulinum*, ou até (iii) intoxicações por substâncias tão simples como o ião magnésio (que, em alguns locais, compete com o cálcio e altera os mecanismos de libertação de acetilcolina).

Se for inibido o transporte activo de colina para o interior da terminação nervosa pré-sináptica, a reutilização da colina para a síntese de acetilcolina é dificultada e há, consequentemente, depleção do mediador das terminações nervosas (a reserpina, fármaco ainda usado no tratamento da hipertensão, tem este efeito).

É igualmente possível que sejam produzidos anticorpos contra constituintes da terminação nervosa (é o que acontece, por exemplo, no síndrome de Eaton-Lambert, no qual o processo de autoimunidade é, em geral, desencadeado por um tumor do pulmão).

Alterações da Fenda Sináptica

Podem ocorrer sempre que há inibição da acetilcolinesterase, (i) por medicamentos como a piridostigmina, neostigmina, fisostigmina, ambenónio, demecário (carbamatos e derivados) ou edrofónio (álcool), ou (ii) por intoxicações resultantes de organofosforados (presentes em muitos insecticidas e pesticidas). O E-605 Forte, que é

um pesticida utilizado contra o escaravelho da batateira, contém paratião (organofosforado), que é regra geral mortal se ingerido, embora também seja absorvido através da pele. O malatião, outro organofosforado, existe em alguns insecticidas.

Causas Pós-Sinápticas

A *Miastenia Gravis* clássica é um exemplo relativamente frequente de uma doença cuja origem está na membrana pós-sináptica (falta de receptores). Contudo, também a membrana pós-sináptica é susceptível a agressões por substâncias químicas como a nicotina ou pela D-tubocurarina (alcalóide extraído da *Condodendrum tomentosum*), o princípio activo do curare. A nicotina é um composto extremamente tóxico. De facto, bastam 40 mg para provocar a morte, ou seja a quantidade existente numa gota de solução pura (ou o equivalente à quantidade existente em dois cigarros). Felizmente que grande parte desta nicotina é destruída pelo calor (enquanto o cigarro arde) e outra parte é dispersada pelo fumo que não é inalado. Por vezes as crianças ingerem cigarros, em vez de os fumarem, mas como a nicotina provoca o vômito acabam por não absorver o suficiente para provocar uma intoxicação letal, embora possa acontecer. Drogas análogas ao curare são muito utilizadas em anestesia geral, para relaxar os músculos do doente que está a ser operado. É o caso do pancurónio, succinilcolina, metocurina (dimetilcurarina), galamina, vecurónio ou atracurónio. A succinilcolina, muito utilizada, tem a particularidade de ser degradada por uma colinesterase do soro (pseudocolinesterase ou butirilcolinesterase), por isso tem uma vida média relativamente breve em circulação e tem curta acção. Contudo, em certos doentes com défice de butirilcolinesterase, ela é degradada muito lentamente e os anestesistas têm grandes dificuldades em reanimar o doente e reverter a curarização.

Existem outras alterações possíveis, mas as referidas são as que ocorrem com maior frequência. Cer-

tas doenças não se enquadram bem nesta classificação, por exemplo, por envolverem simultaneamente mais do que um processo. É o caso de uma forma particular de miastenia, a chamada *Miastenia Congénita*, na qual foram descritas alterações pré-sinápticas (perturbações da re-síntese de acetilcolina na terminação nervosa), da fenda sináptica (ausência de acetilcolinesterase) e deficiências no funcionamento da membrana pós-sináptica (canais iónicos).

Da mesma forma, algumas das substâncias acima mencionadas podem actuar em mais do que um local. A neostigmina é uma dessas substâncias: além de inibir a acetilcolinesterase também se liga aos receptores de acetilcolina da membrana pós-sináptica e provoca uma despolarização prolongada desta, com consequente bloqueio da transmissão neuromuscular.

MIASTENIA GRAVIS – ALGUMAS QUESTÕES

Fernando Morgado

O que é a Miastenia Gravis?

A *Miastenia Gravis* é uma doença crónica que causa fraqueza e fadiga anormalmente rápida dos músculos voluntários. A fraqueza é causada por um defeito na transmissão dos impulsos dos nervos para os músculos. A doença é raramente fatal, mas pode ameaçar a vida quando a fraqueza atinge os músculos da deglutição e da respiração.

O tratamento adequado confere à maioria dos doentes uma apreciável melhoria dos sintomas e muitos deles podem levar uma vida normal e produtiva.

Quais são os sintomas da *Miastenia gravis*?

O início da *Miastenia Gravis* pode ser súbito, com fraqueza muscular severa e generalizada mas, mais frequentemente, os sintomas iniciais são variáveis e subtis, tornando o diagnóstico da doença difícil.

O primeiro sintoma, frequentemente verificado, é a fraqueza dos músculos dos olhos. A doença pode permanecer ou progredir para os músculos da deglutição, fonação, mastigação ou dos membros. Os sintomas variam de doente para doente, mas podem incluir a queda de uma ou de ambas as pálpebras (ptose), desdobramento das imagens ou visão dupla (diplopia), fraqueza dos músculos que mobilizam os globos oculares (estrabismo), dificuldade em engolir com regurgitação dos líquidos pelo nariz (disfagia), dificuldade em falar, com voz nasalada (disfonia), fraqueza nos músculos da mastigação (com tendência para ter a boca aberta), fraqueza do músculo do pescoço (com queda da cabeça para diante, fraqueza dos músculos dos membros, com dificuldade para subir degraus e andar, ou elevar os braços para pentear, barbear ou escrever e, por fim, fraqueza dos músculos respiratórios, o que representa um perigo significativo para o doente.

A fraqueza muscular pode desenvolver-se durante dias ou semanas, ou manter-se ao mesmo nível durante longos períodos.

A severidade da doença varia de doente para doente e, no mesmo doente, pode variar ao longo do dia. A fraqueza tende a agravar-se com o exercício e para o fim do dia e, em geral, melhora parcialmente com o repouso.

Quem adoece com *Miastenia Gravis*?

A doença pode afectar doentes de todas as idades de ambos os sexos mas é duas vezes mais comum na mulher. Não é contagiosa e não é hereditária; se bem que haja alguma controvérsia sobre isto, nenhum dos nossos doentes, cerca de cem, tem outros casos conhecidos na família.

O que é a causa da *Miastenia Gravis*?

Os sintomas da *Miastenia Gravis* são causados por um defeito de transmissão dos impulsos

dos nervos para os músculos, podendo estes permanecer normais.

A transmissão dos impulsos dos nervos para os músculos é normalmente feita por uma substância, a acetilcolina, na junção neuromuscular, provocando uma contracção do músculo.

Na *Miastenia Gravis* o número de receptores da acetilcolina ou sítios nos quais a substância pode ser recebida, encontram-se reduzidos, e isto devido a uma agressão dos receptores da acetilcolina por anticorpos, produzidos pelo sistema imunitário do próprio indivíduo. Este é o sistema normalmente envolvido na luta contra as infecções. A *Miastenia Gravis* é assim designada por doença autoimune porque o sistema imunitário do indivíduo começa a produzir anticorpos que atacam os seus próprios tecidos. A investigação tem mostrado que, na maioria dos doentes com *Miastenia Gravis*, há a circular no sangue anticorpos contra os receptores da acetilcolina; numerosos cientistas encontram-se empenhados na investigação das causas que provocam o início da produção destes anticorpos pelo sistema imunitário dos doentes, desencadeando esta agressão autoimune. Há alguma evidência que a doença se inicia no timo, que é uma massa de tecido linfóide que se encontra no tórax por detrás do esterno.

Qual o papel do Timo na *Miastenia Gravis*?

As células que formam o timo fazem parte do sistema imunitário de um indivíduo normal. O timo é normalmente grande na infância, diminuindo de tamanho com a idade, de tal modo que apenas restam vestígios na idade adulta.

Nos miasténicos adultos, no entanto, o timo pode estar aumentado ou apresentar alterações microscópicas. Alguns (10 a 15%) têm tumores (timomas) benignos.

Se bem que a relação do timo com a *Miastenia Gravis* não esteja totalmente esclarecida, parece que o timo está ligado à produção de anticorpos anti-receptores da acetilcolina ou de outras substâncias que interferem com a transmissão neuromuscular.

Como pode ser tratada a *Miastenia Gravis*?

O uso de medicamentos e da cirurgia do timo, isolados ou em conjunto são razoavelmente eficazes no tratamento da *Miastenia Gravis*.

O tratamento de primeira linha é um medicamento designado anticolinesterase, que facilita a transmissão neuromuscular. Embora não trate a deficiência base dos receptores da acetilcolina, prolonga o efeito da acetilcolina até produzir contracção do músculo.

O tratamento com anticolinesterásicos é benéfico, mas em muitos doentes não é suficiente para levarem uma vida normalmente activa.

A timectomia ou remoção do timo é muitas vezes o passo seguinte. Cerca de 50% dos doentes podem ter a remissão ou melhoras significativas com a timectomia.

A terapêutica com esteróides é por vezes necessária nos doentes mais graves. Os esteróides e outros imunossuppressores, como a azatioprina, são bastante eficazes, produzindo remissão dos sintomas e estão particularmente indicados quando são afectados os músculos da deglutição e da respiração. O seu efeito faz-se sentir no sistema imunitário deprimindo a produção de anticorpos. Infelizmente o seu uso tem de ser prolongado e provocam, por vezes, acções colaterais indesejáveis.

O método de tratamento designado plasmaferese é usado quando os doentes entram na chamada crise miasténica, durante a qual necessitam de respiração assistida.

A plasmaferese consiste na substituição do plasma do doente, é uma espécie de lavagem ao sangue para remoção dos anticorpos que estão a bloquear a transmissão neuromuscular.

O que é uma crise miasténica?

A crise ocorre quando um doente com *Miastenia Gravis* começa com dificuldade em respirar que não responde à medicação, e necessita ser hospitalizado para assistência respiratória, em geral mecânica.

A crise pode ser desencadeada pelo stress emocional, infecção, actividade física, menstruação, gravidez, reacção adversa a certos medicamentos, acidentes, etc.

Que investigação está a ser feita?

Nestes últimos anos esta doença tem sido alvo de extraordinário interesse por parte de

investigadores de todo o mundo, especialmente nos E.U.A. com o apoio da Associação de Distrofia Muscular Americana. Inúmeros trabalhos estão a ser levados a cabo sobre a imunologia da *Myasthenia Gravis*, sobre a bioquímica dos receptores da acetilcolina, etc., a fim de se encontrar resposta para as perguntas que ainda não estão bem esclarecidas, em busca do tratamento que possa curar a doença.