



1^o curso de inverno
**tópicos em
fisiologia
comparada**

12 a 30 jul 2004

departamento de fisiologia
instituto de biociências - usp
<http://www.ib.usp.br/cursodeinverno>

idealização

alunos de pós-graduação do
departamento de fisiologia – ib/usp

elaboração

adriano alonso pereira da cunha
andré fração helene
james fernando malta da silva
jessica ruivo maximino
josé eduardo de carvalho
marcelo alves da silva
merari de fátima ramires ferrari
rodrigo pavão

apoio

pró-reitoria de cultura e extensão
comissão de pós-graduação
instituto de biociências

agradecimentos

gustavo eiji kaneto
gisele ortoli

Índice

<u>NEUROTRANSMISSORES</u>	1
<u>RECEPTORES E SINALIZAÇÃO CELULAR</u>	3
<u>ROTEIRO DE AULA PRÁTICA</u>	5
<u>EVOLUÇÃO DO SISTEMA NERVOSO</u>	6
<u>MECANISMOS CENTRAIS DO CONTROLE CARDIOVASCULAR</u>	12
<u>ROTEIRO DE AULA PRÁTICA</u>	15
<u>HIPERTENSÃO E EXERCÍCIO FÍSICO: UMA BREVE INTRODUÇÃO</u>	19
<u>CONSIDERAÇÕES SOBRE A NEUROFISIOLOGIA DA MEMÓRIA</u>	22
<u>ASPECTOS FISIOLÓGICOS DAS TOXINAS DE ANIMAIS AQUÁTICOS E TERRESTRES</u>	29
<u>AS TOXINAS DE ANÊMONAS DO MAR COMO FERRAMENTAS PARA ENTENDER A FISIOLOGIA DE ÓRGÃOS, TECIDOS E SISTEMAS</u>	32
<u>ROTEIRO DE AULA PRÁTICA</u>	35
<u>A DEPRESSÃO METABÓLICA NOS ANIMAIS</u>	37
<u>TERMORREGULAÇÃO EM INSETOS</u>	40
<u>A RANA E O RATO: UM ESTUDO COMPARATIVO DAS CAPACIDADES METABÓLICAS EM TECIDOS MUSCULARES DE DUAS ESPÉCIES DE VERTEBRADOS</u>	43
<u>ECOFISIOLOGIA DE LAGARTOS</u>	49
<u>COMPORTAMENTO E FISIOLOGIA DE FORMIGAS ATTA</u>	51
<u>RELÓGIO BIOLÓGICO DE MAMÍFEROS: MECANISMOS MOLECULARES E CONTROLE DA RITMICIDADE INTERNA DO ORGANISMO</u>	54
<u>SISTEMA DIGESTÓRIO</u>	56
<u>MECANISMOS DE OSMORREGULAÇÃO EM ANIMAIS</u>	59
<u>EXERCÍCIO TEÓRICO-PRÁTICO</u>	63

NEUROTRANSMISSORES

Lotte Marianne Pires Renault

Laboratório de Neurociências e Comportamento

Neurotransmissores (NTs) são mensageiros químicos utilizados na comunicação entre células do sistema nervoso. Podem ser categorizados por sua origem / estrutura química (ex: monoaminas, peptídeos).

Neurotransmissores podem ser excitatórios ou inibitórios, no que concerne às suas ações imediatas sobre a célula-alvo. Entre os mais comuns NTs excitatórios, estão glutamato e acetilcolina. Ações inibitórias são mediadas por GABA e peptídeos (como opióides). No entanto, o resultado final destas ações não é necessariamente a ativação ou inibição da projeção.

Como exemplo, podemos considerar que a ação de uma projeção liberando NTs excitatórios, como glutamato, sobre interneurônios inibitórios, resultará na ativação destes e em ação inibitória sobre as áreas-alvo destes interneurônios. Por outro lado, a ação de uma projeção liberando opióides (portanto, inibitória) sobre interneurônios inibitórios GABAérgicos resulta na inibição destes e conseqüente liberação das áreas-alvo dos interneurônios.

O resultado final destas ações é um mosaico de ativações / inibições. Isto ocorre em diversos níveis. Deve-se considerar que uma célula recebe uma enorme quantidade de sinapses, e que o resultado final sobre sua atividade é uma somatória determinada pelo balanço de efeitos intracelulares e pela posição das projeções recebidas (sabe-se, por exemplo, que sinapses mais distantes do corpo celular têm efeito mais pronunciado sobre o disparo final, o que é denominado "cable effect"). Além disso, ao nível de um núcleo, a atividade final pode resultar em modulação do disparo basal (em áreas que exibem disparo rítmico espontâneo, os chamados marcapassos), ativação / inibição generalizada, ou inibição parcial paralelamente à ativação seletiva de algumas áreas dentro do núcleo. Ou seja, ativação e inibição convivem lado a lado no SNC. Porque a inibição de uma área dentro de um núcleo, ou mesmo de regiões como um todo, seria interessante?

A comunicação neuronal resulta na percepção sensorial, codificação de informações e planejamento de ações. Estes processos são maciçamente dependentes da ativação e inibição de células ao longo de diferentes vias por diversos NTs. Sabe-se que informações são mantidas no SNC pelo reforço das sinapses em projeções neuronais, e que sua codificação é dependente de como estes neurônios disparam ao longo do tempo. Estas projeções formam uma gigantesca rede, o que permite a ocorrência de associações.

Se é necessário ao indivíduo, no entanto, comparar a situação em que se encontra presentemente com outras vivenciadas no passado que contenham elementos semelhantes, é necessário que apenas uma parcela desta rede seja ativada, enquanto que muitas outras seriam mantidas silentes pela ação de interneurônios inibitórios. De fato, estudos de neuroimagem em tempo real em fatias cerebrais demonstraram que o hipocampo, uma área do SNC que é peça crucial no processamento de memória, permanece sob inibição a maior parte do tempo, e apenas sinais

excitatórios recorrentes através de uma das suas maiores aferências levam à sua subsequente ativação. Porém, esta ativação não é generalizada: algumas áreas são mantidas sob inibição, enquanto outras encontram-se ativas. Ou seja, ocorre uma ativação seletiva. Ativações seletivas em regiões do cerebelo, gânglios da base e medula também estão relacionadas à precisão de movimentos. Na percepção visual, o processo de inibição lateral permite a definição das bordas de uma imagem. Assim, a presença de atividade inibitória está na base da coordenação refinada da atividade nervosa. Por outro lado, a liberação de interneurônios inibitórios previne ativações patológicas, como atividade epiléptica. Além disso, devemos recordar que o custo energético da atividade neuronal representa uma porcentagem alta do metabolismo basal de um indivíduo, o que torna interessante a queda neste gasto, mantendo uma parte deste sistema silente.

A coordenação refinada definida por este mosaico de ativação / inibição foi definida ao longo de um lento processo de evolução do sistema nervoso. Sabe-se que alguns NTs, como acetilcolina, GABA, serotonina e peptídeos (como substância P) já se encontravam presentes em estágios iniciais da escala evolutiva. Alguns receptores, como o colinérgico do tipo nicotínico, com seus característicos sete domínios transmembrânicos, são altamente conservados ao longo da escala evolutiva. Em anelídeos e artrópodes, cujo sistema nervoso é ganglionar, é possível observar neurônios ativados e inibidos por diferentes NTs. Em um estudo clássico, Kandel e col. mapearam um circuito neural em neurônios gigantes de lula, demonstrando a modulação sobre células marcapasso e controle inibitório. Sabe-se que a modulação de gânglios marcapasso pela rede de interneurônios já ocorre em cnidários.

A necessidade por esta modulação refinada tornou-se ainda maior, conforme aumentou o tamanho do sistema nervoso, ao longo da escala evolutiva, com o processo de encefalização, o agrupamento de células em núcleos, até o surgimento dos sistemas nervosos de vertebrados. Neste grupo, o agrupamento de gigantescas populações de neurônios em núcleos, respondendo a múltiplos sistemas de neurotransmissores, aumentou consideravelmente a flexibilidade de ações, percepção sensorial e capacidade de arquivamento de informações. Em uma comparação algo grosseira, poder-se-ia dizer que, em sistemas mais complexos, a ativação maciça sinalizaria um estado de alerta, enquanto ativações mais seletivas e precisas levariam à seleção dos sinais sensoriais.

RECEPTORES E SINALIZAÇÃO CELULAR

Merari de Fátima Ramires Ferrari
Laboratório de Neurotransmissão

Este tópico abordará algumas das possíveis vias de transmissão da informação de uma célula para a subsequente, assim como a sinalização celular com ênfase no sistema nervoso central. Sem pretensão de esgotar o assunto, trataremos também das vias de sinalização intracelular até a regulação da transcrição gênica, assim como interações entre receptores e alguns sistemas de neurotransmissão. Além de discutirmos alguns fatores que modulam a resposta final, particularmente no que diz respeito à regulação neural da pressão arterial.

Para que o transmissor obtenha sucesso em transmitir a informação para as células subsequentes, é necessária a interação deste com seu receptor específico.

Existem basicamente 4 tipos de receptores: os ionotrópicos, os metabotrópicos, os acoplados a enzimas (como a tirosina-quinase) e os intracelulares

A forma de ação destes receptores varia enormemente:

- 1- Os **ionotrópicos** são mais rápidos e geralmente atuam na despolarização celular embora também possam agir modulando a transcrição gênica.
- 2- Os **receptores acoplados à proteína G** (metabotrópicos) desencadeiam cascatas intracelulares envolvendo a adenilil ciclase ou a fosfolipase C.
- 3- Os **receptores associados a enzimas**, seja com atividade enzimática intrínseca ou acoplados à tirosina quinase, também desencadeiam cascatas intracelulares podendo fosforilar as MAP quinases e agir sobre fatores de transcrição.
- 4- Os **receptores intracelulares** são ativados por substâncias capazes de atravessar a membrana citoplasmática como os estrógenos e o óxido nítrico.

Todos os receptores mencionados podem atuar tanto na resposta rápida, que é a despolarização celular, e/ou agir nas respostas a longo prazo, através de regulação da transcrição gênica, por meio dos fatores de transcrição.

A localização dos receptores é muito importante para a eficiência da transmissão do estímulo. Existem os receptores na membrana pós e pré-sináptica, além dos já mencionados intracelulares.

Os receptores na membrana pós-sináptica podem transmitir a resposta ao núcleo das células, regular a atividade de receptores vizinhos e/ou regular a despolarização neuronal. Na membrana pré-sináptica, os receptores podem controlar a liberação de neurotransmissores, e os receptores intracelulares medeiam a resposta a longo prazo.

A presença de receptores é muito importante para a interação da célula com o meio em que se encontra. Desta forma, todos os grupos celulares conhecidos possuem moléculas receptoras de alguma natureza. Existem muito poucos estudos filogenéticos com ênfase nos diversos tipos de receptores. Sabe-se que receptores ionotrópicos estão presentes em células pertencentes aos três grupos filogenéticos (eucariontes, bactérias e arqueobactérias). Os estudos da evolução de receptores

metabotrópicos restringem-se a poucos trabalhos que demonstraram proteínas com 7 domínios transmembrânicos e que se utilizam de fosforilação para transmitir o sinal, análogas aos receptores acoplados à proteína G, identificadas em protozoários e em metazoários ancestrais.

Bibliografia:

Receptores Acoplados à Proteína G:

- Bennett, M.R. (2000) The concept of transmitter receptors:100 years on. (2000) *Neuropharmacology* **39**:523-540.
- Milligan, G. & White, J.H. (2001) Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* **22(10)**: 513-518.
- Clapham, D. E. & Neer, E.J. (1997) G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**:167-203.

Receptores Ionotrópicos:

- Engelman H.S. & MacDermott, A.B. (2004) Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat. Rev. Neurosci.* **5(2)**:135-45.

Evolução de Receptores:

- Martinac, B. & Kloda, A. (2003) Evolutionary origins of mechanosensitive ion channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **82(1-3)**:11-24.
- Parmentier, M.L.; Galvez T.; Acher F.; Peyre B.; Pellicciari R.; Grau Y.; Bockaert J. & Pin, J.P. (2000). Conservation of the ligand recognition site of metabotropic glutamate receptors during evolution. *Neuropharmacology* **39(7)**:1119-31.
- New, D.C. & Wong, J.T. (1998) The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in protozoa and ancestral metazoa. *Biol. Signals Recept.* **7(2)**:98-108.

Fatores de Transcrição:

- Papavassilov, A.G. (1995) Transcription factors. *N. Engl. J. Med.* **332(1)**:45-47.
- Wang, L.L.; Chan, S.H.H. & Chan, J.Y.H. (2001) Fos protein is required for the re-expression of angiotensin II type 1 receptor in the nucleus tractus solitarius after baroreceptor activation in the rat. *Neuroscience* **103(1)**: 143-151.

Revisões sobre o controle cardiovascular pelo SNC:

- Lawrence, A.J. & Jarrott, B. (1996) Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. *Progress in Neurobiology* **48**:21-53
- van Giesbergen, P.L.M.; Palkovits, M. & de Jong, W. (1992) Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarius in cardiovascular regulation. *Physiological Reviews* **72(3)**:791-824.

Sites relacionados:

- <http://www.cis.upenn.edu/~krice/receptor.html>
<http://www.gene-regulation.com>
<http://www.cerebronosso.bio.br>

ROTEIRO DE AULA PRÁTICA AVALIAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES E SEUS RECEPTORES

Merari de Fátima Ramires Ferrari
Laboratório de Neurotransmissão

1. Analisar o padrão de marcação dos seguintes neurotransmissores em tecido nervoso:
 - Tirosina hidroxilase (enzima da cadeia de síntese das catecolaminas – dopamina, noradrenalina e adrenalina).
 - Neuropeptídeo Y
 - Oxido Nítrico Sintase (enzima que converte l-arginina em citrulina e óxido nítrico, um neurotransmissor não convencional).
 - Glutamato
 - GABA
 - Colina acetil transferase (enzima de síntese da acetilcolina)
 - Vasopressina
 - Proteína Fos (produto do gene de expressão primária c-fos)

2. Observar filmes radioautográficos com a marcação de receptores no sistema nervoso central:
 - Receptor alfa-2 adrenérgico
 - Receptores Y
 - Receptores nicotínicos

3. Observar a marcação do RNAm em filme radioautográfico:
 - Tirosina hidroxilase
 - Neuropeptídeo Y e seus receptores
 - Oxido nítrico sintase
 - Colina acetil transferase
 - Receptores nicotínicos
 - Proteína Fos

Questões para reflexão:

1. Quais as vantagens de estudar o RNA, o neurotransmissor e o receptor?
2. Havendo alterações em um dos componentes do sistema, haverá necessariamente alteração na resposta final?

EVOLUÇÃO DO SISTEMA NERVOSO

Adriano Alonso Pereira da Cunha

Rodrigo Pavão

Laboratório de Neurociências e Comportamento

INTRODUÇÃO

Neste módulo discutiremos a evolução do sistema nervoso através de uma abordagem comportamental e neuroanatômica. Serão apresentados experimentos que avaliam as capacidades sensoriais, motoras e cognitivas de animais de diferentes níveis da escala filogenética. Ao mesmo tempo em que apresentaremos as estruturas neuroanatômicas que estariam diretamente relacionadas com essas funções. Uma vez descritos e comparados os sistemas nervosos desses diferentes grupos, serão apresentadas as teorias mais consistentes sobre seus padrões evolutivos.

Antes de iniciarmos a discussão relacionada ao sistema nervoso, façamos uma breve revisão dos conceitos evolutivos. A evolução estaria ocorrendo de uma forma natural e não determinada, pois não sabemos qual será a característica que irá acrescentar valor adaptativo aos indivíduos, ou seja, quais características serão filogeneticamente conservadas. Podemos comparar a evolução a gotas sucessivas de água que percorrem caminhos diferentes ao serem jogadas em uma rocha, não se pode prever qual caminho elas irão percorrer e nem onde irão cair devido a mudanças na umidade, vento, etc. Cada caminho diferente, nessa analogia, seria uma linhagem que pode ter originado os animais atuais, mostrando toda a diversidade de seres que existem hoje.

Cada organismo tem feições neuroanatômicas distintas que, em última instância, refletem sua relação com o meio. O estudo evolutivo do sistema nervoso é feito essencialmente através de evidências indiretas. Isso porque esse sistema não é fossilizável e o comportamento de seres extintos pode apenas ser inferido. As características do sistema nervoso desses seres, como complexidade dos circuitos, conexões sinápticas, organização cortical e subcortical são inacessíveis; o que é observável é o volume da caixa craniana e as impressões nela gravadas. Assim, o estudo do sistema nervoso e do comportamento baseiam-se na premissa de que capacidades funcionais de sistemas filogeneticamente mais antigos são refletidas em animais originários dessas linhagens primitivas.

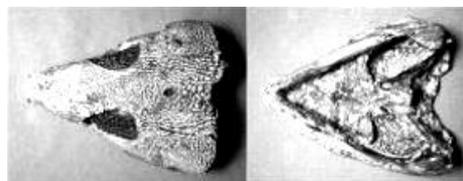


Imagem de crânio fossilizado de *Captorhinus aguti*: informações sobre o sistema nervoso são restritas em registros dessa natureza.

Vale a pena lembrar que essa concepção sobre animais primitivos e derivados, que parece estar intimamente relacionada com a capacidade de processar informação e de agir favoravelmente para benefício individual, não pode ser diretamente interpretada como superioridade. Uma pequena

massa cerebral pode ser mais vantajosa do que uma grande, dependendo das circunstâncias envolvidas. Um cérebro grande e capaz de lidar com muita informação tem gasto energético maior, ampla necessidade de O₂. Limitações a esses fatores podem beneficiar animais com cérebros pequenos e mais econômicos.

Dois princípios nortearam a configuração dos sistemas nervosos dos grandes grupos de animais: (1) a capacidade de integrar mais informação sensorial e motora e (2) o sistema ter dimensões reduzidas, com menor número de neurônios envolvidos. O resultado da atuação conjunta desses padrões resultou em sistemas eficientes, capazes de processar informações diversas e de gerar comportamentos complexos.

Definidos os elementos básicos da evolução do sistema nervoso, apresentaremos agora uma discussão filogenética do tema, apresentando alguns grupos, suas estruturas encefálicas e comportamentos.

Um ser vivo que é capaz de coletar as informações do meio em que vive, e, em seguida, demonstrar uma resposta interna ou externa. Esse ser vivo apresentaria portanto ao menos um sistema sensorial e um sistema efetor. Esse ser vivo poderia ser um homem, que ao sair de casa, entra em contato com vento, e ao sentir essas condições do meio, efetua respostas, sejam estas internas (apresenta um temor involuntário e piloereção) ou externas (decide voltar para o interior de sua casa para buscar um agasalho). Mas não, quem descreveu esse ser vivo não estava se referindo a um ser humano, mas sim a um organismo unicelular, uma ameba. O estímulo era substância p que está usualmente associada a bactérias, das quais as amebas se alimentam. A resposta foi citocinese, os pseudópodos da ameba direcionavam-se no sentido do gradiente de concentração da substância p, ou seja, em direção a bactéria. Integração funcional entre estímulo e resposta, função exercida pelo sistema nervoso. Porém, o termo sistema nervoso não pode ser adotado para esse organismo. Esse termo só será aplicável em níveis superiores da escala filogenética.

O primeiro organismo a apresentar um sistema nervoso verdadeiro pertenceu ao grupo dos cnidários. É considerado um sistema nervoso verdadeiro porque apresenta células especializadas para a conexão entre áreas diferentes, os neurônios. O sistema desses animais permitiu uma comunicação efetiva entre as diferentes partes do animal. Apresenta alta densidade de células sensoriais, principalmente nos tentáculos, e integra estímulos apresentados aos quimiorreceptores com respostas musculares, proporcionando a esse animal uma movimentação adequada no sentido de alcançar sucesso em suas atividades.

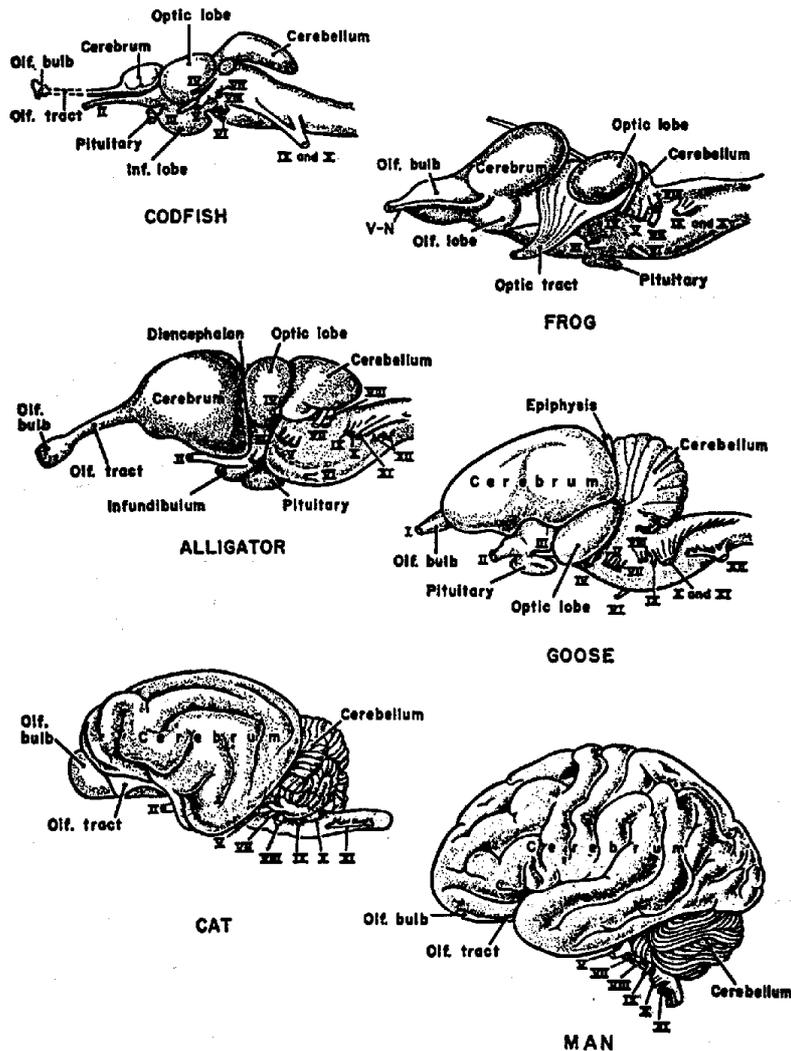
Dentro dos invertebrados, um grupo bastante interessante é o dos insetos himenópteros. Peguemos por exemplo, a formiga. São animais que apresentam alto grau de cefalização, com conexões razoavelmente densas para receptores sensoriais (existem receptores complexos acoplados a olhos compostos altamente eficientes – pelo menos nas castas aladas, rainha e macho). Além disso, estes animais apresentam organização social complexa, com a existência de diversas castas com tarefas específicas. Toda essa complexidade foi possibilitada pelo desenvolvimento de uma estrutura nervosa ampla e eficiente.

O anfioxo pertence ao grupo do protocordados, grupo que é considerado originário dos cordados. O sistema nervoso desse animal é bastante reduzido: o encéfalo é minúsculo e está ligado à órgãos sensoriais rudimentares ou ausentes. Os estímulos processados por esse sistema são essencialmente táteis; não consegue reconhecer comida ou perigo à distância.

Os cordados (grupo que inclui todos os vertebrados e grupos mais primitivos como urocordados e céfalocordados) apresentam a maior riqueza de estruturas neuroanatômicas e de comportamentos. Grupo originário de ancestral invertebrado (não se sabe de qual grupo, diversas teorias consistentes afirmam a origem em diferentes grupos), teve obviamente alteração do seu sistema nervoso. Organizações neuronais do grupo filogeneticamente mais antigo (invertebrado) foram reorganizadas e possivelmente suplementadas por estruturas adicionais. Os vertebrados apresentam um plano nervoso comum, com concentração de áreas sensoriais na cabeça (=cefalização, já presente no ancestral invertebrado) e organização de tecido nervoso juntamente ao eixo cordal (estrutura que mais adiante na escala filogenética será denominada medula espinhal).

Os sistemas nervosos dos vertebrados foram alterados progressivamente na escala filogenética. Apesar de contarmos com um registro fóssil incompleto para propor estudos evolutivos mais consistentes, é provável que tenham existido ancestrais em que os sentidos de olfato e visão surgiram consecutivamente, permitindo que o sistema percebesse estímulos distantes. São desconhecidos também os ancestrais em que apareceram os sentidos de gustação, equilíbrio, dor e temperatura. Sabe-se que a audição apareceu mais recentemente.

Os peixes atuais mais primitivos, os ciclostomados, tem um sistema nervoso com o padrão básico de componentes motores e sensoriais, tronco cerebral, corpo estriado e telencéfalo. Conforme os organismos se tornaram mais complexos (complexidade aqui pode ser entendida como um maior número de palavras para se descrever o animal), cada nova capacidade sensorial teve que ser integrada centralmente com as outras sensações. E o encéfalo teve seu tamanho aumentado. Os peixes primitivos tornaram-se predadores móveis. Essa maior mobilidade deve ter exercido pressão evolutiva para o aumento de algumas regiões do encéfalo. O sistema nervoso e o comportamento dos peixes eram simples, mas superior ao dos grupos primitivos devido a maior quantidade de informação e de movimento que estava sendo integrada. Acredita-se que as alterações observáveis no sistema nervoso de peixes cavernícolas (que tiveram redução das áreas relacionadas com o processamento visual, como o tecto óptico, e aumento de áreas relacionadas com o olfato, como o trato olfativo e as áreas telencefálicas associadas) sejam semelhantes às alterações que teriam ocorrido nesses peixes primitivos que se tornaram móveis: a alteração do padrão de estímulos e respostas que tem que ser processado é diferenciada, e o sistema acaba sendo moldado pelo processo evolutivo para atender esse processamento e aumentar a eficiência. É como se houvesse uma conversa entre o processo evolutivo e os sistemas sensoriais e sistema nervoso.



Representação de encéfalos de vertebrados: peixe (bacalhau), anuro (sapo), réptil (crocodilo), ave (ganso) e mamíferos (gato e homem)

Os anfíbios foram o grupo vertebrado que conquistou ambientes terrestres. As barbatanas transformaram-se em membros. O encéfalo ainda era pequeno, simples e cilíndrico. Olfato continuou sendo importante e a visão era útil para reconhecimento de padrões. Tato, equilíbrio e audição foram retidas.

Os répteis apareceram posteriormente e desenvolveram ampla gama de estruturas. Alguns desenvolveram uma armadura para proteção, como nas tartarugas; outros atingiram tamanhos enormes, como os dinossauros. Suas respostas comportamentais eram estereotipadas e limitadas, mas seus encéfalos tubulares eram capazes de processar maior integração sensorio-motora do que o de anfíbios. Uma pequena quantidade de neocórtex foi adicionada ao paleocórtex. Alguns répteis podiam agarrar objetos, usar os membros como armas e ficar de pé e correr sobre as pernas traseiras. O julgamento dos répteis em resposta às necessidades de comida e de defesa contra inimigos era superior a dos anfíbios. Os arcossauros, dinossauros e seus descendentes, os crocodilos e

aves, em muitos aspectos eram “superiores” aos répteis modernos como lagartos e cobras, em relação ao tamanho do cérebro e comportamento.

Os répteis dependem principalmente da visão e do olfato, pouco da audição, para informação distante. Muito dos dados da visão são processados na retina e no tronco cerebral, e relativamente menos no prosencéfalo, dessa forma o cérebro propriamente dito ainda é pequeno em relação aos mamíferos.

Répteis da linhagem que deu origem aos mamíferos, os sinápsidas, de tamanho próximo ao de um camundongo, foi um dos primeiros grupos répteis a aparecer. Eles estão extintos agora, e já tinham passado sua densidade e diversidade máxima antes de aparecerem os primeiros dinossauros. Mais tarde, os terápsidas surgiram. Eles existiram durante o tempo desde os primeiros répteis até os mamíferos, e tinham características anatômicas desses dois grupos. Em um mundo ocupado pelos répteis andando durante o dia e descansando durante a noite, sinápsidas e terápsidas tornaram-se noturnos. Eles expandiram seus sentidos de olfato e audição à distância, pois eles andavam geralmente à noite. Visão por cones provavelmente regrediu parcialmente, mas os bastonetes foram preservados, assumindo o mesmo padrão de visão observado em mamíferos modernos. A melhora da audição necessária para a sobrevivência resultou em aumento da área responsável pelo processamento desse tipo de informação, e por uma encéfalo maior com sinapses no tronco cerebral, tálamo e cérebro propriamente dito. O olfato, porém, é diferenciado em relação aos demais sentidos, pois não tem retransmissão com o tronco cerebral e tálamo. Os animais fazendo a transição entre répteis e mamíferos tiveram que integrar os sentidos de olfato, visão e audição, e mais uma vez houve pressão para aumentos relativos e absolutos do cérebro.

As aves originaram-se de grupos reptilianos, podem ser considerados répteis com penas ao invés de escamas córneas. Seus encéfalos são relativamente maiores aos de répteis do mesmo tamanho, mas esse aumento não é de neocórtex (relativo aos mamíferos). O neocórtex primordial das aves pode ser incorporado a núcleos telencefálicos subcorticais. A estratégia evolutiva observada nas aves diverge da estratégia dos mamíferos.

A maior parte das aves tem boa visão, mas olfato é menos importante para criaturas voadoras do que para criaturas terrestres. Os centros visuais apresentam-se aumentados, assim como áreas relacionadas à coordenação do voo. Tecido neural adicional foi necessário para o desenvolvimento de comportamentos definidos geneticamente de naturezas complexas. A habilidade dos pássaros para voar milhares de quilômetros para refúgios de inverno e para voltar toda primavera é um exemplo desse comportamento inato, assim como a construção de ninhos, comportamentos de corte e hábitos alimentares.

Com o declínio do número de répteis, mamíferos placentários de hábito insetívoro ganharam espaço. Esses animais e os que deles derivaram tornaram-se diurnos. A necessidade de reintegrar o sistema visual de alto desempenho e o novo desenvolvimento dos cones resultaram em aumento de entrada de informações, e um encéfalo maior. Mamíferos mantiveram o tamanho do cérebro estável durante longo período.

Essas informações geram uma impressão de evolução “progressiva”, de que animais cada vez mais desenvolvidos foram originados conforme o passar do tempo. A evolução, porém, seguiu caminhos diferenciados, não só progressivamente (pelo aumento da capacidade integrativa sensorio-motora), mas também regressivamente (redução dessa capacidade) e estavelmente, de acordo com as pressões seletivas exercidas pelo meio. Existem animais que mantiveram sua estrutura básica por longos períodos de tempo, mesmo que algumas delas tivessem encéfalos pouco desenvolvidos, mas que eram capazes de manter-se em ambientes diferentes, resistentes e flexíveis a alterações efetivas do meio.

Os mamíferos possuem hoje grande diversidade e habitam os mais variados ambientes com uma ampla gama de comportamentos. O encéfalo de mamíferos aumentou enormemente, permitindo que o homem tenha se tornado o vertebrado dominante no planeta, mas o aumento do tamanho total não significa o mesmo tenha ocorrido com cada parte. A maioria dos mamíferos não-humanos tem um sistema olfatório aumentado medido pelo tamanho do bulbo olfatório, cheirar é relativamente mais importante para esses animais do que para os primatas mais próximos ao homem, nos quais essa área regrediu. Em seres humanos temos uma região neocortical muito desenvolvida, acompanhada por uma expansão do cerebelo e tronco.

Bibliografia:

Sarnat, B H & Netsky M G (1981). **Evolution of Nervous System**. Oxford University Press.

Maturana H R & Varela F J (1988). **The Tree of Knowledge: The biological roots of Human Understanding**. New Science Library Shambhala.

Bullock T H (1977). **Introduction to Nervous Systems**. W.H. Freeman and Company

Anderson P A V (1989). **Evolution of the First Nervous Systems**. Plenum Press.

Sites

<http://www.ib.usp.br/~gfxavier/geoclima.html> (texto sobre evolução utilizado no curso Fisiologia I do curso de Biologia)

<http://www.fortunecity.com/campus/biology/752/snc.htm> (Anatomia Comparada do Sistema Nervoso Central Humano e de Ratus norvegicus)

MECANISMOS CENTRAIS DO CONTROLE CARDIOVASCULAR

Jessica Ruivo Maximino
Laboratório de Neurotransmissão

1. INTRODUÇÃO

A perfusão tecidual é garantida pela manutenção da força motriz da circulação em níveis adequados e razoavelmente constantes ao longo de toda a vida dos indivíduos, estejam eles em repouso ou desenvolvendo diferentes atividades comportamentais. Os níveis de pressão arterial (PA), gerados pela atividade cardíaca e vascular são controlados por diversos sistemas inter-relacionados que realizam funções específicas.

Assim, conhece-se alguns mecanismos de ajuste da PA:

- Mecanismo de controle a curto-prazo da PA (Mecanismos neuro-humorais)
- Mecanismos de controle a longo-prazo da PA (Mecanismos de fluidos corporais)

2. CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL PELO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O Sistema Nervoso Central (SNC) tem um papel importante na regulação do sistema cardiovascular, por controlar tanto a atividade do sistema nervoso autônomo quanto a liberação de fatores hormonais circulantes. O SNC modifica agudamente a PA e os batimentos cardíacos, facilitando a homeostase e as respostas apropriadas ao meio ambiente (Wyss *et al* tem um papel fundamental na regulação a curto-prazo da PA.

iniciado em terminações nervosas localizadas no seio carotídeo e no arco aórtico, as quais captam K (Kohno *et al*, 1990).

(Wang *et al* 1990) e algumas áreas encefálicas parecem ter uma grande importância na regulação cardiovascular.

envolvido na recepção e integração de múltiplos processos viscerossensoriais, incluindo o controle (Lambert & Jones, 1996). Ele é o principal

no arco aórtico, dos quimiorreceptores dos corpos carotídeos e das aferências provenientes do (Mason & Ruck, 1971; Ipski *et al*, 1975; Iriello & Alaresu 1981).

O NTS influencia o controle cardiovascular através de suas projeções para núcleos medulares (OTAKE, 1993), área postrema (SAPER *et al.*, 1983), locus coeruleus (LC) e núcleos hipotalâmicos, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (SAWCHENKO & SWANSON, 1982).

Assim, além do NTS outros centros bulbares estão envolvidos no controle cardiovascular, como neurônios da porção caudal (CVL) e da porção rostral (RVL) da medula ventrolateral (VLM), áreas da formação reticular nesta região do SNC. A CVL recebe projeções diretas do NTS que, por sua vez, envia projeções inibitórias à RVL. A RVL envia projeções para os neurônios pré-ganglionares simpáticos na coluna intermédia lateral da medula espinhal exercendo dessa forma, efeito modulatório sobre o tônus do sistema nervoso simpático (revisado por DAMPNEY, 1994). Essas projeções constituem o barorreflexo, assim, a circuitaria do barorreflexo é ativada em decorrência da variação da PA.

O NTS é rico em variedade e quantidade de neurotransmissores, sendo que a participação destes no controle neural da PA vem sendo muito discutida (VAN GIESSBERGEN *et al.*, 1992; LAWRENCE & JARROT, 1996). Mais de trinta neurotransmissores bem como seus respectivos receptores são descritos no NTS, sendo que o papel funcional de cada um deles ainda não foi adequadamente demonstrado. Além disso, é possível que interações entre sistemas de neurotransmissão neste núcleo ampliem a capacidade de modulação das respostas que acontecem após determinado estímulo pressórico.

O LC, localizado na ponte também tem participação relevante nas respostas reflexas autonômicas e neuroendócrinas em decorrência de alterações da PA. O LC envia projeções para diversas áreas do encéfalo e medula espinhal (FOOTE *et al.*, 1983), recebendo aferências principalmente da medula oblonga (ASTON-JONES *et al.*, 1986).

Outro núcleo importante no controle da PA é o PVN, localizado bilateralmente ao terceiro ventrículo, o PVN recebe e envia projeções diretas para o NTS podendo modular o processamento bulbar do controle cardiovascular (SAWCHENKO & SWANSON, 1982). A estimulação deste núcleo pode causar tanto efeito pressor quanto depressor. O efeito difere para cada órgão alvo. O fato de existir projeções diretas do PVN para a coluna intermédia lateral e do NTS para o PVN, pode-se relacionar esse circuito com o barorreflexo (SAWCHENKO & SWANSON, 1982).

No SNC diversos mediadores químicos participam do controle/modulação da PA, tais como as catecolaminas, o neuropeptídeo Y (NPY), a angiotensina II (Ang II), o gaba, o glutamato, a vasopressina entre outros.

Referências Bibliográficas:

- ASTON-JONES, G., ENNIS, M., PIERIBONE, V.A., NICKELL, W.T., SHIPLEY, M.T. The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. **Science**, 7;234 (4777):734-737, 1986.
- CIRIELLO, J. & CALARESU, F.R. Projections from buffer nerves to the nucleus of the solitary tract: an anatomical and electrophysiological study in the cat. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 3(2-4): 299-310, 1981.
- DAMPNEY, R.A.L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.**, 74(2): 323-364, 1994.
- FOOTE, S.L., BLOOM, F.E. & ASTON-JONES, G. Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. **Physiol. Rev.**, 63(3): 844-914, 1983.

- KUMADA, M., TERUI, N. & KUWAKI, T. Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. *Prog. Neurobiol.*, 35(5):331-61, 1990.
- LAWRENCE, A.J. & JARROTT, B. Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. *Prog. Neurobiol.*, 48(1): 21-53, 1996.
- LIPSKI, J., MCALLEN, R.M. & SPYER, K.M. The sinus nerve and baroreceptor input to the medulla of the cat. *J. Physiol.*, 251(1): 61-78, 1975.
- MIURA, M. & REIS, D.J. The paramedian reticular nucleus: a site of inhibitory interaction between projections from fastigial nucleus and carotid sinus nerve acting on blood pressure. *J. Physiol.*, 216(2): 441-460, 1971.
- OTAKE, K., NAKAMURA, Y. & EZURE, K. Projections from the commissural subnucleus of the solitary tract onto catecholamine cell groups of the ventrolateral medulla. *Neurosci. Lett.*, 12;149(2):213-216, 1993.
- SAPER, C.B., REIS, D.J. & JOH, T. Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat. *Neurosci. Lett.*, 11;42(3):285-291, 1983.
- SAWCHENKO, P.E. & SWANSON, L.W. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 1;205(3):260-272, 1982.
- VAN GIERSBERGEN, P.L., PALKOVITS, M. & DE JONG, W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. *Physiol. Rev.*, 72(3):789-824, 1992.
- WYSS, J.M., OPARIL, S. & CHEN, YUI-CHEN The role of the central nervous system in hypertension. In: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, edited by J. H. Laragh and B.M. Brenner. New York: Raven, p.679-701, 1990.

Site interessante:

www.pubmed.com

ROTEIRO DE AULA PRÁTICA NEUROANATOMIA

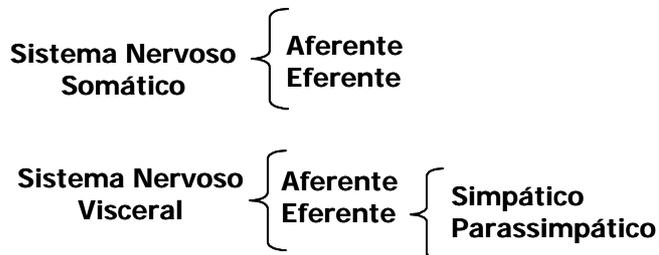
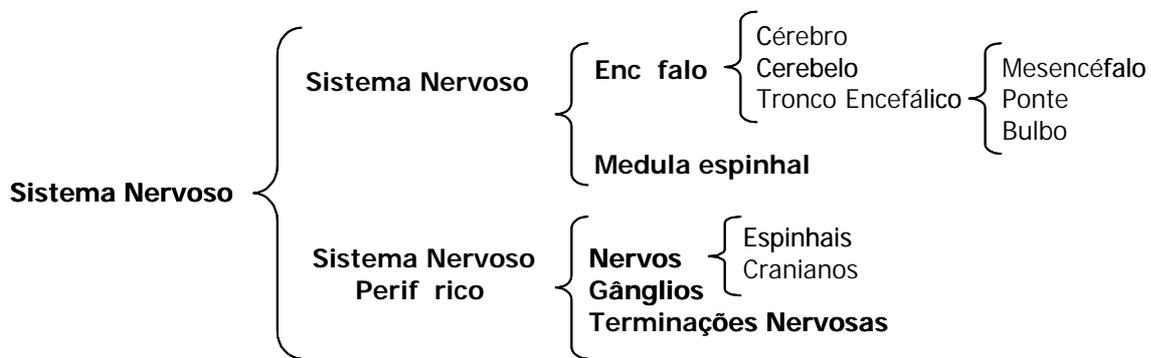
Jessica Ruivo Maximino

Laboratório de Neurotransmissão

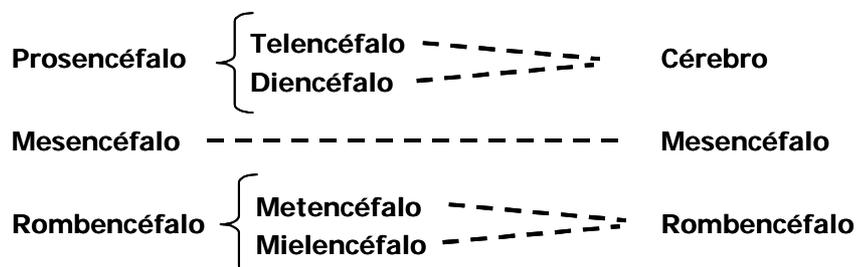
OBJETIVO: Apresentar o Sistema Nervoso (SN) e suas possíveis divisões didáticas.

O SN é um todo. Sua divisão em partes tem um significado exclusivamente didático, pois várias delas estão intimamente relacionadas do ponto de vista morfológico e funcional. O SN pode ser dividido levando-se em conta critérios anatómicos, funcionais e embriológicos.

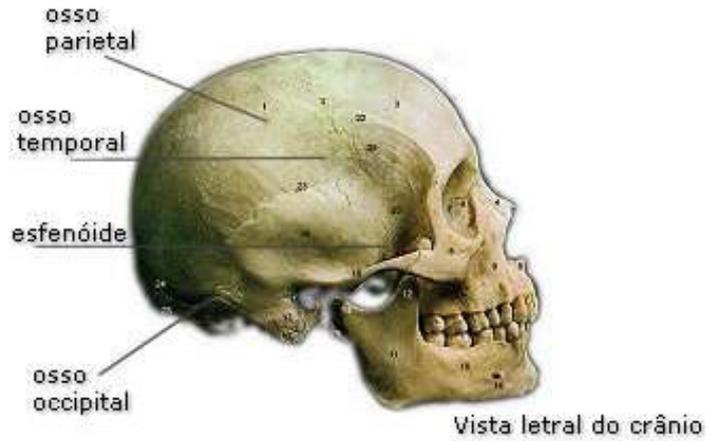
DIVISÃO DO SISTEMA NERVOSO COM BASE EM CRITÉRIOS ANATÔMICOS



DIVISÃO DO SISTEMA NERVOSO COM BASE EM CRITÉRIOS EMBRIOLÓGICOS

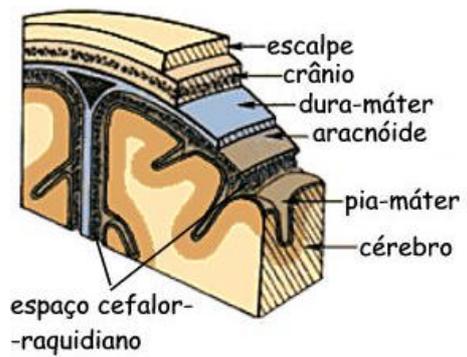


1) **Crânio:** sustentação e proteção para o Sistema Nervoso Central.



2) **Encéfalo** (cérebro, cerebelo e tronco encefálico).

a) Para o tecido ósseo não entrar em contato com o tecido nervoso existem membranas fibrosas chamadas meninges, que são: dura-máter, pia-máter e aracnóide.



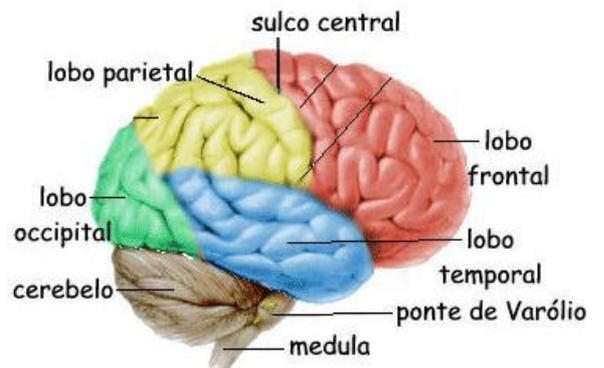
b) Cérebro (Telencéfalo + Diencefalo): giros e sulcos (as artérias e veias ficam localizadas preferencialmente nos sulcos).

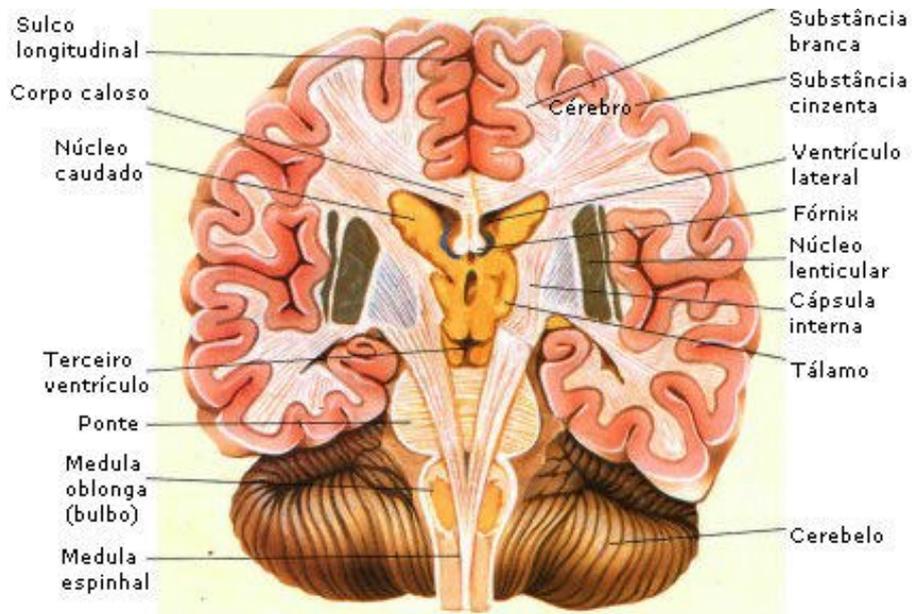
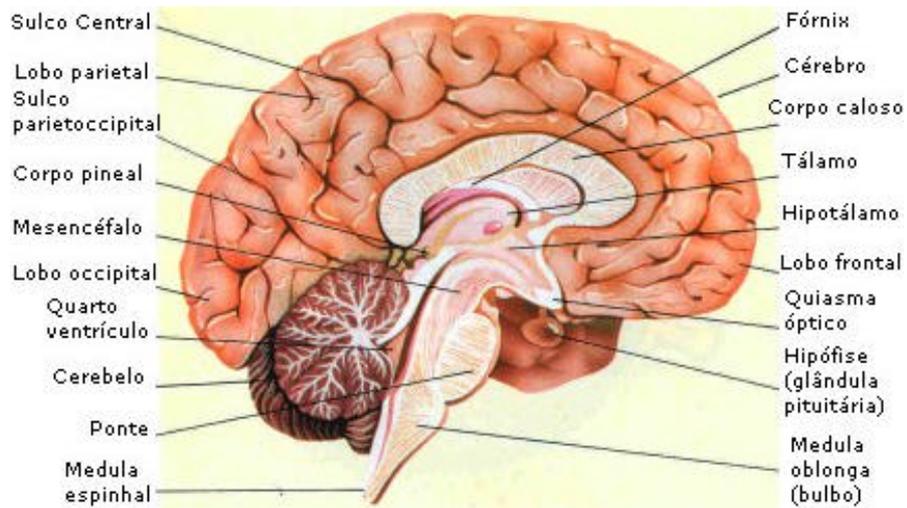
Lobos (frontal, parietal, temporal e occipital)

c) Cerebelo

d) Tronco Encefálico: mesencéfalo, ponte e bulbo

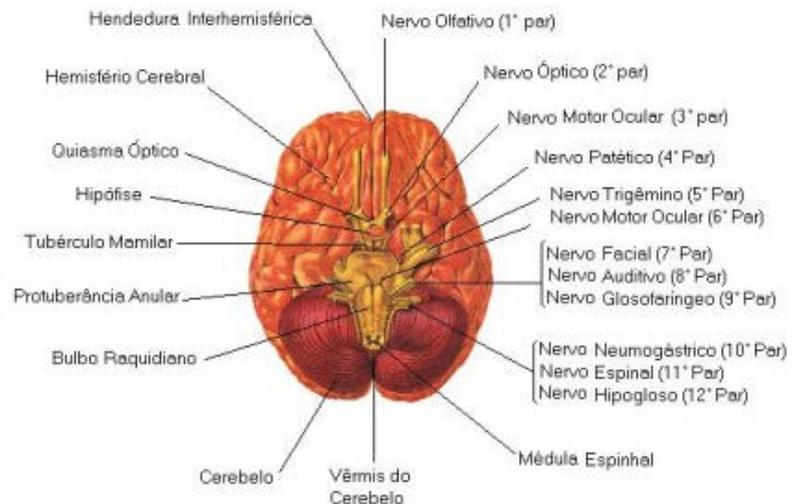
e) Tálamos: Comunicação



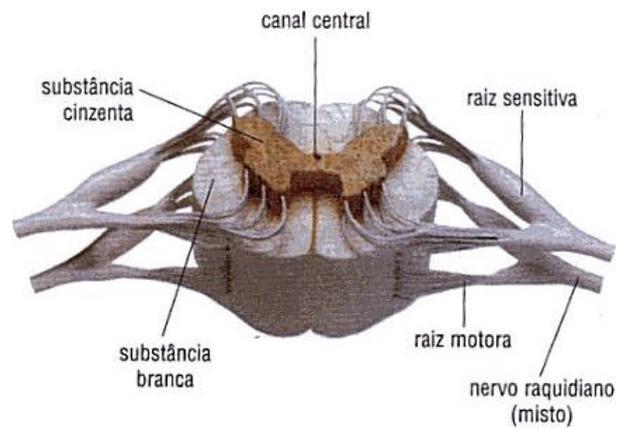
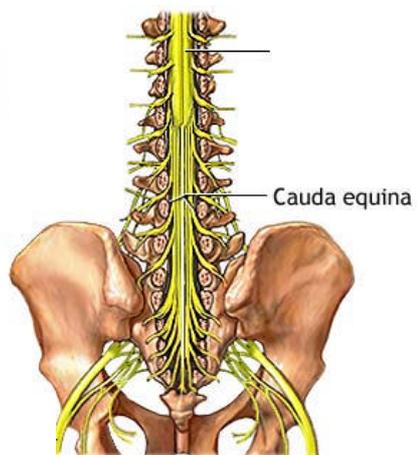


3) Pares de Nervos Cranianos

- I - bulbo olfatório / trato olfatório
- II - nervo óptico / trato óptico
- III - nervo oculomotor
- IV - nervo troclear
- V - nervo trigêmeo
- VI - nervo abducente
- VII - nervo facial
- VIII - nervo vestibulo coclear
- IX - nervo glossofaríngeo
- X - nervo vago
- XI - nervo acessório
- XII - nervo hipoglosso



- 4) Cauda eqüina
- 5) Vértebra: Músculo e medula
- 6) Observar a reconstituição do encéfalo

**Referências:**

Machado, A.B.M. Neuroanatomia Funcional. 2ª edição. São Paulo. Ed. Atheneu, 2000.

HIPERTENSÃO E EXERCÍCIO FÍSICO: UMA BREVE INTRODUÇÃO

Regiane Xavier de Moraes

Laboratório de Neurotransmissão

Neste tópico será sucintamente abordado a interação do exercício físico com a hipertensão, além de atualidades e tendências em pesquisa na área da fisiologia do exercício e doenças cardiovasculares.

O sedentarismo pode contribuir para o aparecimento e/ou agravamento de doenças cardiovasculares como a hipertensão. De acordo com 3º Consenso brasileiro de hipertensão (1998), 15 a 20% da população brasileira está acometida. Atualmente 90 a 95% dos idosos são hipertensos.

Durante os últimos tempos, o exercício físico, bem como as suas implicações e conseqüências, tem sido extensamente estudado por cientistas de todo o mundo. Usualmente, os exercícios, aeróbicos e/ou de resistência, mais recomendados e utilizados são a caminhada e corrida em esteiras rolantes, a natação em piscinas, a musculação com pesos e pedalar em bicicletas ergométricas. Em animais normalmente são utilizados a roda de corrida espontânea, a esteira para corrida induzida e a natação. Estas pesquisas buscam compreender as ações do exercício no organismo, quais os mecanismos centrais e periféricos que as norteiam e, principalmente, quais os benefícios que poucas horas de mudança na rotina diária podem causar tanto para uma pessoa ou animal saudável como para os acometidos por patologias.

A realização do exercício físico provoca uma série de respostas fisiológicas nos diversos sistemas corporais, em particular no cardiovascular e nervoso. Objetivando manter a homeostasia celular, diante do aumento das necessidades metabólicas, há incremento do débito cardíaco, redistribuição do fluxo e aumento da perfusão sanguínea para a musculatura em atividade.

Sabe-se que exercícios físicos regulares, quando são adequadamente prescritos, e de baixa intensidade podem provocar alterações autonômicas importantes que influenciam o sistema cardiovascular. Dentre estas, a atenuação da hipertensão arterial tanto em humanos quanto em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). A atividade física contribui para a melhora do controle barorreflexo e redução de 8 a 11 mmHg da pressão arterial sistólica e diastólica, respectivamente, em indivíduos hipertensos (Hagberg, et al.,2000). Estudos mostram que a diminuição da pressão arterial deve-se à diminuição do débito cardíaco que está associado à diminuição da frequência cardíaca pós exercício (bradicardia de repouso) (Véras-Silva, et. al.,1997). Entretanto, alguns autores propõem que exercícios crônicos provocam queda na resistência vascular sistêmica e, conseqüentemente na redução da pressão arterial (Nelson, et al.,1986). O treinamento físico normaliza o tônus simpático, que controla a frequência cardíaca em SHRs (Gava, et al.,1995) e diminui a atividade nervosa simpática em humanos, ou seja, estes resultados sugerem que a atividade física pode modular a atividade nervosa simpática para o coração e vasos periféricos, explicando, em partes, a queda pressórica.

Modulações específicas da frequência cardíaca durante o exercício constituem um mecanismo muito preciso de manutenção do suprimento do fluxo sanguíneo para o cérebro, coração, pele e músculos em atividade.

Os neurotransmissores vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) são produzidos em neurônios magnocelulares do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) que envia e recebe projeções do Núcleo do Trato Solitário (NTS). O PVN e o NTS são importantes centros de controle cardiovascular (Michelini e Morris, 1999).

A AVP facilita a resposta taquicárdica durante a atividade física. Contraditoriamente, a OT diminui a taquicardia e contribui para a bradicardia. Desta forma, estes neurotransmissores possuem efeitos específicos e opostos no controle da frequência cardíaca. Este balanço entre o estímulo excitatório (AVP) e inibitório (OT) provê a eficiência do ajuste fisiológico requerido momentaneamente, já que a taquicardia é necessária para suprir a maior demanda de fluxo sanguíneo e metabólica da musculatura em atividade durante o exercício. Assim, no NTS de indivíduos treinados, a AVP e OT atuam como moduladores da frequência cardíaca durante a atividade física por potencializar ou moderar, respectivamente, a taquicardia (Michelini, 2001).

É importante enfatizar que as vias vasopressinérgicas e ocitocinérgicas do tronco encefálico não são os únicos mecanismos centrais envolvidos na gênese da taquicardia. Assim, projeções descendentes vasopressinérgicas e ocitocinérgicas do PVN para o NTS são parte do mecanismo central de modulação do reflexo barorreceptor no controle da frequência cardíaca durante o exercício e outras condições ambientais (Michelini, 2001).

Podem ser observadas ainda outras alterações cardiovasculares decorrentes do treinamento físico tais como a hipertrofia cardíaca. Exercícios aeróbicos, por meio do aumento de volume sanguíneo, podem estimular adaptações na morfologia cardíaca, metabolismo energético e funções. Estes podem produzir hipertrofia cardíaca ecêntrica, na qual o aumento da massa ventricular é proporcional ao aumento da câmara cardíaca (Frohlic, et al., 1992). Trata-se de uma resposta fisiológica e compensatória fundamental para suportar o aumento da carga de trabalho. Para que tal modificação aconteça ocorre no músculo cardíaco aumento da síntese proteica, aumento da espessura das miofibrilas, aumento de filamentos contráteis dentro da fibra muscular, etc. Estas alterações estruturais, morfo-funcionais e metabólicas do coração induzidas pelo exercício resultam em maior volume de ejeção sistólica, que torna-se mais vigorosa, e maior esvaziamento ventricular.

Entretanto, a hipertrofia cardíaca pode se instalar em resposta a certos estados patológicos crônicos como e hipertensão arterial. Na hipertrofia concêntrica o aumento da massa ventricular não é proporcional ao aumento da câmara cardíaca. Desta forma o trabalho cardíaco é feito contra uma excessiva resistência ao fluxo sanguíneo. O coração hipertrofiado pode falhar e tornar-se incapaz, em casos mais graves, de prover o fluxo sanguíneo normal para o indivíduo hipertenso.

Em suma, o exercício físico crônico de intensidade baixa a moderada possui implicações clínicas importantes já que pode reduzir ou mesmo abolir a necessidade de uso de medicamentos anti-hipertensivos, diminuindo, desta forma, o custo do tratamento, extinguindo efeitos colaterais e

principalmente promovendo melhora na qualidade de vida de indivíduos hipertensos. Assim pode ser tido como uma importante conduta não farmacológica no tratamento da hipertensão arterial.

Referências Bibliográficas Citadas

- FROHLIC, E.D., et al. The Heart in Hypertension. **N. England. J. Med.** v.327, p. 998-1008, 1992.
- GAVA, N.S.; VÉRAS-SILVA, A.S.; NEGRÃO, C.E.; et al. Low-Intensity Exercise Training Attenuates Cardiac β -adrenergic Tone During Exercise in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension.** v.26 (2), p.1129-1133, 1995.
- HAGBERG, J.M.; PARK, J.J.; BROWN, M.D. The Role of Exercise Training in the Treatment of Hypertension: an Update. **Sports Med,** v. 30, p. 193–206,2000.
- MICHELINI, L.C. Oxytocin in the NTS - a New Modulator of Cardiovascular Control During Exercise. **Annals New York Acad. Sci.** v.940,p.206-220,2001.
- MICHELINI, L.C.; MORRIS, M. Endogenous Vasopressin Modulates the Cardiovascular Responses to Exercise. **Annals New York Acad. Sci.** v.897, p. 198-221,1999.
- NELSON, L.; JENNINGS, G.L.; ESLER, M.D.; et al. Effect of Changing Levels of Physical Activity on Blood-pressure and Haemodynamics in Essential Hypertension. **Lancet,** v. 2, p. 473–476, 1986.
- VÉRAS-SILVA, A.S.; MATTOS, K.C.; GAVA, N.S.; et al. Low-intensity Exercise Training Decreases Cardiac Output and Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Am J Physiol: Heart Circ Physiol,** v.273(6 Pt2), p. H2627-H2631, 1997.
- Referências Bibliográficas Sugeridas
- DUFLOTH, D.L.; MORRIS, M.; MICHELINI, L.C. Modulation of Exercise Tachycardia by Vasopressin in the Nucleus Tractus Solitarii. **Am.J.Physiol.** v.273,p.R1271-R1282, 1997.
- KRAMER, J.M.; BEATTY, J.A.; PLOWER,E.D.; WALDROP, T.G. Exercise and Hypertension: a model for Central Neural Plasticity. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v.29(1-2), p.122-6, Jan, 2002.
- KRAMER, J.M.; PLOWEY,E.D.; BEATTY,J.A.; LITTLE,H.R.; WALDROP,T.G. Hypothalamus, Hypertension and Exercise. **Brain Res Bull.** v.53(1), p.77-85,2000.
- McARDLE, W.D.; KATCH,F.I.; KATCH, V.L. Fisiologia do Exercício: Energia, Desempenho e Função. p190-225.Guanabara Koogan: RJ.
- NEGRÃO, C.E.; RONDON,M.U.P.B. Exercício Físico, Hipertensão e Controle Barorreflexo da Pressão Arterial. **Rev Bras Hipertens.** v.8(1),p.89-95,jan-mar,2001.
- NEGRÃO, C.E.; RONDON,M.U.P.B; KUNIYOSHI,F.H.S.; LIMA, E.G. Aspectos do Treinamento Físico na Prevenção de Hipertensão Arterial. **Rev Hipertensão.** v.4 (3), 2001.
- SILVA, G.J.J.; BRUM,P.C.; NEGRÃO,C.E.; KRIEGER,E.M. Acute and Chronic Effects of Exercise on Baroreflexes in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension.** v.30(3),p. 1997.
- TURNER, D.L. Cardiovascular and Respiratory Control Mechanisms During Exercise: an Integrated View. **J.Exp.Biol.** v.160, p.309-340, 1991.

Sites Relacionados

www.cardiol.br
www.sbh.org.br

CONSIDERAÇÕES SOBRE A NEUROFISIOLOGIA DA MEMÓRIA

André Frazão Helene

Laboratório de Neurociências e Comportamento

1. **Proposta:**

- aula teórica com duração de uma a duas horas

2. **Objetivo:**

- tratar de forma sucinta da expressão da memória no SNC

3. **Conceitos:**

- bases de neuroanatomia funcional
- técnicas de abordar experimentalmente o problema da relação cérebro-função
- sistemas de memória

4. **Material didático:**

- apenas aula com utilização de projetor digital

Texto de apoio

A atividade e o funcionamento do SNC estão diretamente ligados à sua capacidade de gerar a partir basicamente da ativação individual de células neuronais processos que em última instância permitem gerar atitudes tão sofisticadas quanto dirigir um carro, lembrar o nome de uma cidade ou tomar uma decisão, considerando diferentes informações e expectativas simultaneamente.

A proposta presente aqui pretende abarcar estas questões, tentando aproximar propostas experimentais e a vida cotidiana, sempre com um enfoque de análise formal da natureza anátomo-funcional das funções expressadas pelo SNC.

Sistemas de memória

O uso de um termo único pode sugerir que memória é um sistema unitário, uma entidade independente à qual um único sistema responde. No entanto, quando falamos de memória temos de nos referir a muito mais do que apenas um sistema simples e unitário. Sob o termo "memória" estão presentes todos os processos de retenção, gerenciamento e evocação de informações, sejam estes por períodos de tempo que podem ser tão curtos quanto frações de segundo até períodos tão longos como uma vida inteira. Informações estas que abarcam a capacidade de arquivar informações as mais variadas: sobre nós mesmos e sobre nosso ambiente.

A noção de que memória pode ser dividida em diferentes componentes é antiga e muito baseada na observação de casos clínicos neurológicos, que sempre tiveram papel vital ao longo da história dos estudos da memória. Um dos mais clássicos casos clínicos foi estudado e descrito por Brenda Milner e William Scoville e publicadas em 1957, sobre o paciente H.M.. Após passar por uma cirurgia realizada por Scoville para extirpação de um foco epiléptico grave, que envolveu a remoção bilateral de parte considerável de seu córtex temporal medial e hipocampo (Figura 1), o paciente H.M. apresentou um caso de perda de suas capacidades de formação de novas memórias (amnésia). Apesar desta não ser a única origem possível de casos de amnésia (pacientes com a doença de

Korsakoff também apresentam um quadro de amnésia, apesar de terem lesões em estruturas não corticais), as síndromes amnésicas se mostram de natureza extremamente seletiva. Pacientes amnésicos embora não consigam se lembrar da maioria dos eventos que experienciam tem muitas de suas funções de memória preservadas. Por exemplo, a capacidade de aprendizagem de novas habilidades, motoras ou perceptuo-cognitivas estão mantidas, mesmo que não acompanhadas da capacidade de reconhecer isto por parte do paciente, exatamente pela seletividade apontada. Da mesma forma, a capacidade de manter informações por curtos períodos de tempo também está mantida, favorecendo o conceito de modularidade de funções presente no sistema (Figura 2).

Figura 1. Representação do encéfalo humano normal e do paciente H.M. após remoção do foco epiléptico.

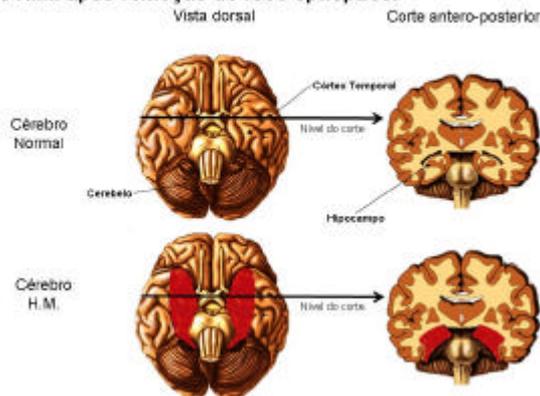


Figura 2. Representação das perdas e manutenções apresentadas pelo paciente H.M..



Quantos tipos de memória existem?

O estudo dos processos de memória vem se beneficiando do conceito de modularidade de funções, isto é, da noção de que memória compreende um conjunto de habilidades mediadas por diferentes módulos do sistema nervoso, que funcionam de forma independente, porém cooperativa. O processamento de informações nesses módulos dar-se-ia de forma paralela e distribuída, permitindo que um grande número de unidades de processamento influencie outras em qualquer momento no tempo, e que grande quantidade de informações seja processada concomitantemente.

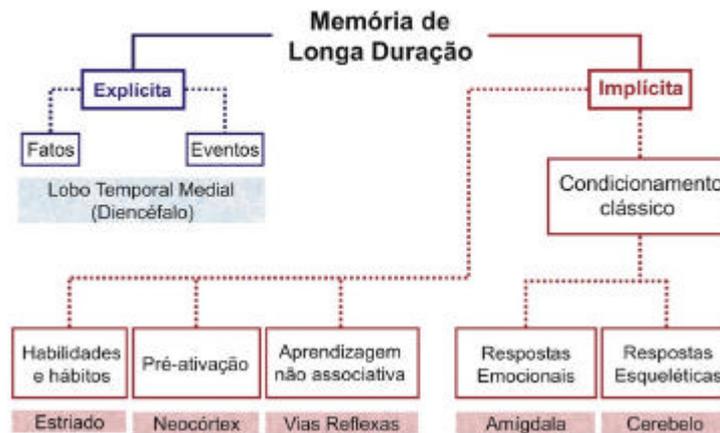
Memória de longa duração

Memória de longa duração se refere a qualquer retenção de natureza perene e duradoura. Esta pode ser dividida em duas diferentes modalidades, ou módulos. A primeira, chamada de **declarativa**, se refere à habilidade de armazenar e recordar ou reconhecer de maneira consciente e passível de declaração fatos e eventos. Esta é tipicamente descrita pela declaração verbal (de onde advém o nome declarativa) mas também pode se dar através de reconhecimento ou de uma imagem. No exemplo do caso H.M. é exatamente esta modalidade de memória que foi perdida, fazendo com que o paciente não se "lembre". Assim esta modalidade de memória poderia ser descrita como um "saber que" (Figura 3).

Diferentemente, a memória **implícita** (ou procedimental), se refere à capacidade de aprender novas habilidades motoras ou perceptuo-cognitivas (Figura3). Estas, por seu caráter não consciente de execução e aquisição, são tarefas que demandam treino longo e repetitivo e que muito

difícilmente podem ser adquiridas de outra forma que não pela execução em si da tarefa em questão. Sua evocação se dá, necessariamente, pela execução da habilidade e poderia ser descrita como "saber como". É exatamente esta habilidade que está preservada em pacientes amnésicos, tal como é o caso do paciente H.M..

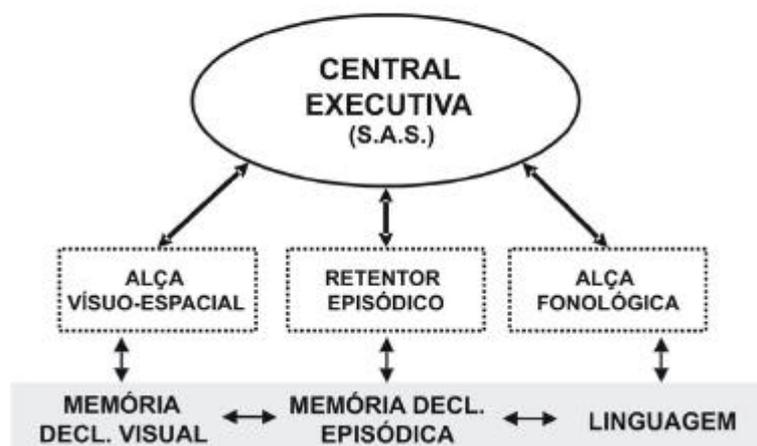
Figura 3. Taxonomia dos sistemas de Memória de Longa Duração



Memória Operacional (inicialmente descrito como "de curta duração")

Memória operacional é um conceito hipotético que refere-se ao arquivamento temporário da informação para o desempenho de uma diversidade de tarefas cognitivas. Embora ela seja usualmente identificada com (e mesmo tratada como sinônimo de) memória de curta duração, esta última mostrou-se por demais simples para lidar com os tipos de retenção de informação por curtos períodos de tempo evidenciados experimentalmente. Assim, desenvolveu-se o conceito de memória operacional como um sistema de capacidade limitada e com múltiplos componentes, responsáveis não só pela manutenção de informações por curtos períodos mas também pela capacidade de selecionar estímulos relevantes no ambiente e entre as informações de longa duração (Figura 4).

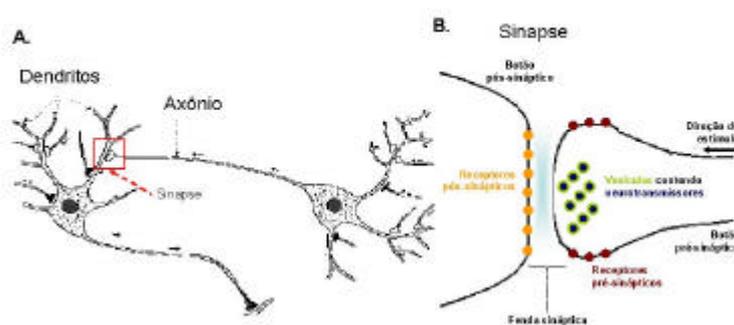
Figura 4. Representação esquemática do conceito de Memória Operacional



A essência da memória

Sabe-se hoje que a aquisição de memória basicamente se dá pela modulação das sinapses, nome dado ao processo pelo qual duas células nervosas se conectam (Figura 5). A partir da descrição das sinapses, conceito primeiramente proposto por Wilhem Waldeyer e posteriormente demonstrado por Ramón y Cajal, mudanças na organização de conexões sinápticas têm sido exaustivamente associadas aos processos de aprendizagem e memória em uma diversidade de espécies de invertebrados e vertebrados, favorecendo a interpretação sobre a ubiquidade destes mecanismos nos processos de arquivamento de informações. Sendo assim, podemos descrever memória pela facilitação - e pela eliminação seletiva - de ligações entre células neuronais, que desta forma se agrupam funcionalmente em agregados (nós) e propiciam a conexão posterior destes entre si, também por modulação de conexões sinápticas, gerando a possibilidade destes nós representarem em si o arquivamento de uma informação.

Figura 5. Representação esquemática da comunicação entre dois neurônios através de uma sinapse química

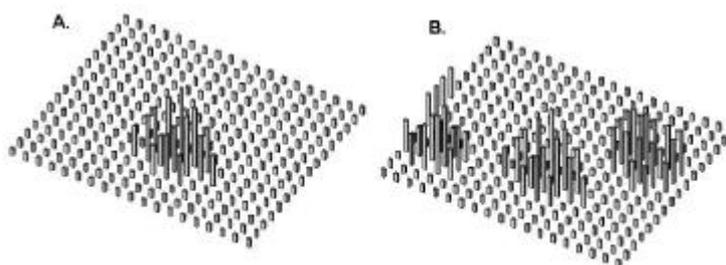


Para termos uma idéia do que representa na prática esta característica associativa do funcionamento do sistema nervoso na geração de memórias, assim como para vislumbrarmos o poder de arquivamento de informações deste sistema, vale ressaltar que estima-se que tenhamos cerca de cem bilhões de células neuronais (ou neurônios) no nosso sistema nervoso. Mais ainda, que cada uma destas células tem em média vinte mil conexões (sinapses) com outras células. Ou seja, sendo o sistema nervoso um sistema que traz em si a riqueza de poder arquivar informações através de conexões entre cada uma de suas células componentes, o sistema nervoso humano tem em si uma ordem de grandeza inimaginável resguardada em sua estrutura.

Levando adiante o fato de sabermos que memórias se estruturam em redes de conexões sinápticas de neurônios podemos montar um mapa mais claro do que estamos falando. Haveria, no sistema nervoso, uma grande quantidade de unidades dedicadas de processamento inerentemente plástico, cada qual devotada a uma tarefa específica mas simples. Quando ativadas, essas unidades excitam e inibem outras ao longo de uma rica rede de conexões. Algumas acabam por gerar ligações associativas cuja força pode ser alterada em função de diferentes fatores. Seguindo o raciocínio,

novas informações geram novas ativações, gerando novas conexões que serão somadas àquelas já existentes, tornando-se assim um novo "ramo" de ativação a partir de um nó anterior. Nessas redes, conjuntos de nós podem representar informações da memória compartilhadas entre diferentes arquivamentos (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática da atividade das unidades ("nó") de uma rede nervosa durante a recordação de duas experiências relacionadas.



Topologia da Memória

Para entender melhor a formação e a topografia de memórias é útil pensar que o córtex sensorial primário e as áreas motoras do córtex são repositórios de uma forma em muito inata de memória, chamada de memória filética, ou "memória das espécies". No nascimento estas áreas já contêm em sua estrutura de conexões sinápticas as "experiências" essenciais selecionadas evolutivamente ao longo do tempo, sendo basicamente informações de natureza simples sobre sensação e movimento. Sem dúvida podemos chamar esta estrutura básica de conexões sinápticas de memória, uma vez que são informações que adquiridas, estão armazenadas e podem facilmente ser evocadas. Um bom exemplo disso pode ser visto no comportamento de mamar dos bebês, um comportamento extremamente complexo, que envolve a utilização de grande número de músculos sincronizadamente e que certamente será evocada pela estimulação correta.

Poder caracterizar memória frente à observação da forma como esta se estrutura topologicamente no sistema nervoso traz em si a possibilidade de ampliarmos a abrangência do debate sobre memória. O sistema nervoso, em seu processo histórico de interação com o ambiente, reage não apenas a estímulos, mas também às contingências espaciais e temporais entre os estímulos, e também destes com suas respostas - inicialmente seguindo regras básicas já determinadas em suas estruturas sinápticas inatas e colhendo informações de resposta de maneira muito abrangente e inespecífica. Com o acúmulo destes registros sobre ocorrências anteriores o sistema passa a ser treinado, identificando regularidades na ocorrência desses eventos, formando memórias e, conseqüentemente, passando a poder gerar previsões (probabilísticas) sobre o ambiente. Desta forma, passa a agir antecipatoriamente frente ao ambiente. Uma das conseqüências deste processo é o desenvolvimento de intencionalidade; ou seja, como resultados almejados podem ser previstos com base em registros sobre regularidades passadas, o sistema pode gerar ações que levem

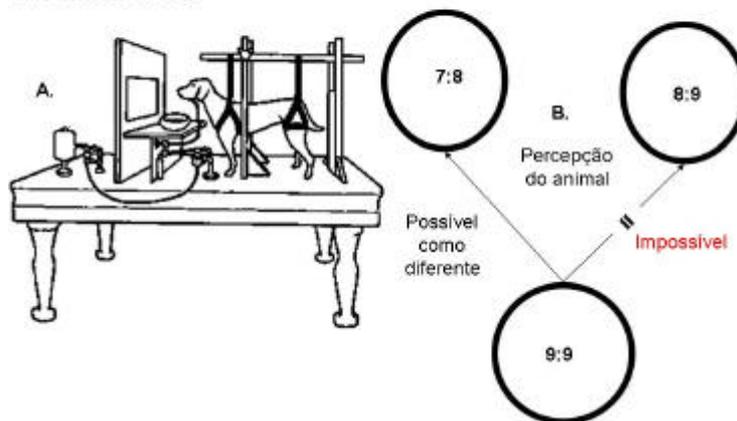
a resultados desejados, ao invés de simplesmente esperar que eles ocorram desta forma quase que aleatoriamente.

Considerações possíveis

A busca por regularidades no ambiente gera a possibilidade de previsão que se identificadas adequadamente agirão diretamente no sucesso das decisões que serão tomadas. Por outro lado, centrar esforços na busca de regularidades observando pistas não informativas no ambiente terão o resultado oposto: tomadas de decisão equivocadas. No entanto muitas vezes a detecção de regularidades se torna extremamente difícil, seja por uma inadequação do treino ao que fomos expostos, seja pela própria natureza do estímulo em questão. Por exemplo, um indivíduo neurótico, em última análise não é capaz de discriminar entre estímulos realmente perigosos e aqueles inofensivos. Exatamente por isso tem medo de gatos, cachorros, elevador, de outras pessoas, ou as mais variadas condições de estimulação inócua. Da mesma forma, o neurótico pode se tornar incapaz de escolher entre ocupações realmente importantes e desnecessárias, dedicando um tempo enorme a atividades como lavar as mãos ou não pisar em faixas na rua.

Este efeito, de produção de neuroses, é possível de ser replicado em animais de laboratório. Ivan Pavlov, cientista russo nascido em 1849 e que teve importância decisiva nos estudos da psicologia experimental, produziu animais neuróticos. Após condicionar cachorros a salivarem frente à apresentação de um círculo mas não de uma elipse (associando temporalmente estes estímulo à oferta e à não oferta de alimento), Pavlov passou a aproximar a forma da elipse ao do círculo (Figura 7). O limite ao qual os animais conseguiam diferenciar adequadamente os dois estímulos era de elipses quase circulares de proporção entre o tamanho dos eixos que a compunham de 7 para 8. A partir deste ponto, elipses mais circulares (no caso com proporções de 8 para 9, por exemplo) se tornaram indissociáveis dos círculos, para os animais. Esta exigência era demasiada para a capacidade de discriminação do animal. A saliva punha-se a correr inicialmente diante da elipse, depois diante do círculo e, finalmente, diante de qualquer um deles ou mesmo de ambos, sem distinção. O cão punha-se a ganir e latir ferozmente para a tela, tentava saltar da mesa e cortar as amarras com os dentes. Daí por diante o animal passou a ser inútil para experimentação. Salivava ao ver a experimentadora, a sala de experiências ou ainda qualquer outro estímulo. Aparentemente a capacidade de discriminação do animal sofrera colapso quase completo, tornando-o, dessa forma, um animal neurótico.

Figura 7. Representação esquemática do arranjo experimental de Pavlov para condicionar cachorros (a) e dos estímulos que os animais foram capazes e incapazes de discriminar (b).



No entanto este é um exemplo simplista do que passamos no dia a dia ao longo de nossas vidas. Apesar de ser importante identificarmos situações simples e específicas possivelmente perigosas, tais como mentir na frente de crianças apesar de repreendê-las severamente quando mentem (fazendo com que a criança não consiga detectar qual o estímulo importante na situação, já que mentir não parecer ser), as preocupações válidas são em geral de natureza muito mais abrangentes.

Diferente de outros animais, temos cérebros extremamente generalistas. Ou seja, estamos aptos a desenvolver diferentes habilidades frente às demandas de nosso ambiente. Na prática talvez jamais sejamos tão bons para lembrar onde guardamos as coisas como os animais especialmente adaptados a guardar alimento antes do inverno o são, de maneira a poder achá-los durante a época de frio. No entanto seremos muito melhores em tarefas variadas nas quais estes animais não teriam sucesso algum, ao mesmo tempo em que teremos um desempenho satisfatório em uma tarefa de recordação. Isto depende somente do treino ao qual seremos expostos para tanto, e aqui temos de entender treino como muito mais do que apenas uma vivência curta para desempenho de uma tarefa, temos de considerar todos os estímulos aos quais passamos ao longo de nossa vida.

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DAS TOXINAS DE ANIMAIS AQUÁTICOS E TERRESTRES

Dr. Joacir Stolarz de Oliveira

Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantã

O fascínio apresentado por animais aquáticos e terrestres é devido, em grande parte, pela imensa variedade de formas anatômicas e matizes de cores apresentados por seus corpos e também pela grande capacidade de adaptação aos diferentes ambientes em que vivem, seus diferentes hábitos de vida e suas relações com os outros seres. Outra característica bastante marcante e que aparece desde microorganismos até alguns vertebrados é a capacidade de produzir e/ou acumular substâncias tóxicas, as toxinas¹, que são empregadas em diversas estratégias envolvidas na defesa contra predadores, no ataque a presas potenciais, além da sua utilização na comunicação química intra e interespecífica.

Dentro deste contexto, atualmente é conhecido uma enorme diversidade e complexidade de toxinas que compõem os venenos² e as peçonhas³ de organismos, tanto aquáticos (marinhos e de água doce) como terrestres. Algumas peçonhas foram desenvolvidas para a captura de presas como ocorre, por exemplo, nas glândulas de serpentes, escorpiões e aranhas, nos nematocistos de águas vivas e anêmonas do mar e nos arpões (ferrões) de moluscos marinhos do gênero *Conus*. Outras, estão voltadas quase que exclusivamente para a defesa em ambientes altamente competitivos, como por exemplo àquelas que são encontradas em peixes (peixe-pedra, peixe-escorpião, etc.) e em alguns anfíbios. Já os venenos são encontrados desde organismos unicelulares, como algas e dinoflagelados, e ao longo dos muitos filos que compreendem os metazoários como os chaetognatos, nemertíneos, esponjas, moluscos, muitos peixes (peixe-porco, balistes, baiacus, etc.) e mesmo em aves, como às pertencentes ao gênero *Pithouia* (Pituís da Papua Nova Guiné) e mamíferos monotremados, o ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*).

No que diz respeito à natureza química das toxinas, tanto de peçonhas quanto de venenos, esta pode ser a mais diversa possível, variando desde compostos de baixos a elevados pesos moleculares, protéicos ou não, polares ou apolares, termoestáveis ou termolábeis, etc. Muitos compostos não protéicos podem ser encontrados, como por exemplo os poliéteres produzidos por dinoflagelados marinhos e que acumulam-se em moluscos bivalves filtradores, e as moléculas heterocíclicas como as toxinas guanidínicas (tetrodotoxina e saxitoxina) encontradas em moluscos,

¹ Toxinas são substâncias tóxicas com maiores ou menores ações específicas em sistemas biológicos e que ocorrem em peçonhas e venenos (Meier & Stocker, 1989).

² Venenos (do inglês, *poison*) – são produtos metabólicos produzidos ou armazenados em órgãos de um determinado organismo e que afetam a um outro quando estes são ingeridos, podendo também atuar de modo artificial por via parenteral. (Freyvogel & Perret, 1973).

³ Peçonhas (do inglês, *venom*) – substâncias originadas em glândulas especializadas e que estão associadas a ductos excretores, possuindo ou não uma estrutura inoculadora (Freyvogel & Perret, 1973).

crustáceos, equinodermos e peixes. Estas substâncias, algumas vezes podem chegar ao homem através da cadeia alimentar, podendo provocar sérios casos de envenenamentos alimentares. Também são conhecidas aminas, presentes nas peçonhas de aranhas, alcalóides encontrados nas peles de anfíbios, etc. De uma maneira em geral, compostos protéicos apresentam-se mais freqüentemente e em maior quantidade nas peçonhas e venenos, e por sua vez, são as moléculas mais investigadas do ponto de vista farmacológico. Muitos peptídeos e proteínas são encontrados em escorpiões, aranhas, anêmonas moluscos e anfíbios.

Devido à imensa diversidade química encontrada nas toxinas muitas estratégias e tecnologias de purificação e elucidação estrutural tiveram que ser desenvolvidas, sendo que somente mais recentemente com a popularização e um maior acesso a equipamentos de elevado custo (como os empregados em espectrometria de massas e na análise proteômica) e a busca por novas moléculas visando ao emprego na biotecnologia é que muitas toxinas puderam ser caracterizadas. Além disto, no que diz respeito às toxinas protéicas, o avanço da biologia molecular veio possibilitar a clonagem, expressão e a conseqüente obtenção de tais substâncias em grandes quantidades, permitindo a realização de estudos estruturais e de estrutura-função, empregando técnicas de ressonância nuclear magnética e de cristalografia.

Do ponto de vista fisio-farmacológico as ações das toxinas podem ser as mais variadas. Dentre elas destacam-se as ações neurotóxicas, hemolíticas, cardiotônicas, necróticas, antimicrobianas, enzimáticas, etc.

A ciência que trata das substâncias tóxicas produzidas ou acumuladas em organismos vivos, suas propriedades e seu significado biológico para o organismo envolvido é a Toxinologia (Meier & Stocker, 1989)⁴. A Toxinologia emprega muitos dos conhecimentos desenvolvidos em diferentes sub-áreas da Biologia como a Fisiologia, Farmacologia e a Ecologia para auxiliar na investigação das toxinas, visando à elucidação dos mecanismos de ação destas substâncias, suas aplicabilidades tanto na ciência como medicina ou na indústria e, em alguns casos, à busca por terapias cada vez mais eficazes a serem empregadas em casos de envenenamentos.

A presente aula tratará dos principais grupos de animais considerados venenosos e/ou peçonhentos, sejam eles terrestres ou aquáticos, destacando suas principais toxinas produzidas e/ou acumuladas, bem como alguns aspectos relativos aos mecanismos de ação e interações fisiológicas envolvidas.

Bibliografia:

- Freitas, J. C. Nomenclatura em Toxinologia. Relações com a comunicação química entre organismos e propriedades biológicas das toxinas. *Mem. Inst. Butantan*, **53(2)**: 191-195.
Freyvogel, T. A. & Perret, B. A., 1973. Notes on Toxinology. *Experientia*, 29 (11): 1317-1452.
Meier, J. & Stocker, K. 1989. Review article: On the significance of animal experiments in Toxinology. *Toxicon*, **27(1)**: 91-104.

Sugestões de leitura:

⁴ Freitas (1991) simplifica: "Toxinologia refere-se ao estudo das toxinas".

- Freitas, J. C.; Rangel, M.; Oliveira, J. S.; Zaharenko, A. J. & Rozas, E., (2003) An outline on marine toxinology studies in the Brazilian coast. *Comments on Toxicology*, **9**: 1-22.
- Halsted, B. (1967). Poisonous and venomous animals of the world, **vol. 2**. *US Governmental Printing Office*, Washington. 844p.
- Kaul, P. N. (1990). Drugs Molecules of Marine Origin. *Progress in Drug Research*, **35**: 521-557.
- Lozoya, A. V. (1994). Envenenamientos por animales - animales venenosos y urticantes del mundo. Ediciones Diaz de Santos S.A., Madrid. 342p.
- Oliveira, J. S. & Freitas, J. C. (2001). Produtos Naturais Marinhos: características dos envenenamentos alimentares e substâncias de interesse farmacológico. *Higiene Alimentar*, **15 (80/81)**: 22-33.
- Rash, L. D. & Hodgson, W. C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, **40**: 225-254.
- Rochat, H. & Martin-Euclaire, M. F. (2000). Animal Toxins – Facts and Protocols. Birkhäuser Verlag, Berlin. 365p.

AS TOXINAS DE ANÊMONAS DO MAR COMO FERRAMENTAS PARA ENTENDER A FISIOLOGIA DE ÓRGÃOS, TECIDOS E SISTEMAS.

André Junqueira Zaharenko

Laboratório de Produtos Naturais Marinhos

As anêmonas do mar são animais que pertencem ao filo Cnidaria e a classe Anthozoa. Todas as anêmonas, assim como os celenterados em geral, possuem estruturas celulares microscópicas, similares a arpões, denominadas de nematocistos, responsáveis pelo papel de paralisar presas e também atuam na defesa dos animais. Estas estruturas contêm potentes neurotoxinas paralisantes que agem sobre crustáceos e peixes pelo simples contato com esses animais. Essa estratégia é de vital importância para os mais distintos animais, desde esses cnidários, passando por moluscos predadores, escorpiões, aranhas e até serpentes.

Todos esses tipos de animais produzem toxinas protéicas e peptídicas em glândulas especializadas e as injetam, a partir de estruturas também especializadas na inoculação, como ferrões, presas e, no caso dos cnidários, nematocistos. Durante muitos anos os cientistas em geral se debruçaram em tentativas de purificar e elucidar os mecanismos de ação das toxinas, ainda que por décadas as limitações tecnológicas e operacionais dificultassem essa tarefa.

Um dos aspectos mais importantes que devemos nos focar, quando vamos tentar investigar quais são os possíveis mecanismos de ação e alvos das toxinas, é exatamente qual o tipo de animal predado pelo nosso objeto de estudo. As anêmonas, por exemplo, predam em geral peixes e crustáceos planctônicos. Essas presas, por sua vez, são de rápida locomoção e poderiam facilmente escapar de um predador que também não fosse rápido na captura.

Quando pensamos nos ambientes ocupados pelas anêmonas, logo devemos nos ater ao fato de que esses animais são sésseis, ou seja, vivem fixos em um substrato rochoso e basicamente não se movem. Se as presas das anêmonas são animais de rápida locomoção, as toxinas direcionadas a sua captura devem ter um efeito o mais efetivo e letal possível. Seguindo nessa linha de raciocínio, os alvos mais conhecidos onde as toxinas anêmonas atuam são: na condução nervosa e na contração muscular das presas. Toxinas que bloqueiam a neurotransmissão, levando a paralisia seguida de morte, são as moléculas mais investigadas nesse grupo de animais até hoje.

Remetendo aos conhecimentos básicos de fisiologia e biologia celular, sabemos que um potencial de ação (PA) é evocado basicamente pela mudança de voltagem do interior de uma célula nervosa através da entrada de íons sódio (despolarização) e a saída de íons potássio na mesma. Este último processo é um pouco mais tardio e permite o restabelecimento da voltagem inicial no interior da célula (repolarização), o chamado potencial de membrana. A seqüência desses eventos, controlados refinadamente pelos canais para Na^+ e K^+ dependentes de voltagem, leva a transmissão do impulso elétrico, com consequências fisiológicas importantes para a comunicação neuronal e a contração muscular. Para uma revisão completa, a leitura do capítulo 11 (páginas 523-547) do livro

MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL (Alberts et al., 3ª e 4ª edições; 1994, 2002) é bastante recomendada.

Durante a passagem de um PA de um neurônio a outro, temos no neurônio pré-sináptico, durante a despolarização, a abertura de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem próximos ao botão sináptico. Quando se abrem, esses canais permitem o influxo de Ca^{2+} que provoca, subsequentemente, a alteração da concentração intracelular desse íon e a ativação de maquinarias secretórias de neurotransmissores. Vesículas contendo neurotransmissores são liberadas na fenda sináptica e estas ligam-se aos respectivos receptores pós-sinápticos, propagando o PA ou desencadeando eventos secundários importantes para a fisiologia celular. A contração muscular desencadeia-se da mesma maneira, apenas diferindo na sequência de eventos pós-sinápticos desencadeadas pela ligação da acetilcolina (no caso de mamíferos, por exemplo) ou do glutamato (no caso de crustáceos e invertebrados) nos respectivos receptores das fendas sinápticas. É importante ressaltarmos que nesse caso não há um neurônio pós-sináptico e sim uma musculatura inervada por um neurônio pré-sináptico.

Essa revisão de conceitos básicos é importante quando nos deparamos com os mecanismos de ação de neurotoxinas de anêmonas e de outros animais peçonhentos. A maioria dos peptídeos de anêmonas descritos e estudados age em canais para Na^+ ou para K^+ dependentes de voltagem. Retardam o processo de inativação dos canais de Na^+ e bloqueiam os canais de K^+ , produzindo um influxo enorme de íons Na^+ e uma diminuição drástica da saída de íons K^+ nas células. Isso faz com que o PA tenha sua amplitude e duração aumentadas dramaticamente.

Para a fisiologia celular, a liberação de neurotransmissores passa a ser tremenda, levando a contrações musculares que não cessam, paralisando um animal que tenha sofrido injeções diretas dessas toxinas em seus tecidos.

Existem, atualmente, cerca de 10 subtipos de canais de Na^+ dependentes de voltagem (os chamados, Nav) distribuídos nos sistemas nervosos central e periférico, tecido cardíaco, medula espinhal e músculo esquelético. São proteínas transmembranares que diferem levemente em termos de seqüências primárias e parâmetros cinéticos.

Como nosso grupo de pesquisa vem trabalhando há longos anos com neurotoxinas de anêmonas do mar, recentemente publicamos um trabalho no qual a comparação dos efeitos de 3 toxinas praticamente idênticas difere pouco dependendo dos subtipos de Nav ensaiados (Oliveira et al., 2004). Ou seja, isso mostra que a atuação das moléculas em seus sítios de ligação é sutilmente modulada por alguns aminoácidos em suas estruturas. Dependendo do subtipo de Nav ensaiado, havia efeitos preferenciais ou não de cada uma das toxinas. Durante a aula expositiva os resultados serão apresentados e discutidos com os alunos. A leitura do trabalho de Oliveira et al., 2004- EM PUBLICAÇÃO, também é requerida.

Conforme os diferentes tipos de toxinas são purificados e caracterizados, cada vez mais essas moléculas são empregadas como ferramentas farmacológicas, para em laboratório induzirem seus efeitos e ajudarem os cientistas a investigar diferentes aspectos da fisiologia.

Muitas companhias farmacêuticas revendem toxinas com esse propósito, a preços elevadíssimos. Acessando o site www.alomone.com e clicando em *Ion Channel Modulators* e *Neurotoxins*, podemos ver a lista de diferentes toxinas com seus respectivos preços.

Embora companhias farmacêuticas forneçam toxinas como substâncias para pesquisa básica, muitas delas vêm investindo milhões de dólares no desenvolvimento de fármacos a partir dessas moléculas. Como exemplo, existem peptídeos que bloqueiam especificamente canais de K⁺ dependentes de voltagem expressos em linfócitos-T. Esse tipo de bloqueio leva a uma supressão do sistema imune e, conseqüentemente, esse tipo de toxina torna-se altamente atrativo como um remédio para tratar artrite reumatóide e rejeição a órgãos transplantados. Na revisão apresentada por Chandy et al., 2001, os alunos podem acompanhar os avanços recentes nesse sentido.

Finalizando, queremos mostrar que a partir de protótipos naturais pode-se obter substâncias altamente eficazes para o estudo da fisiologia e que sirvam também como modelos para o desenvolvimento de medicamentos.

Bibliografia:

- Alberts, B. et al. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing. New York. 3rd edition. 1294p.
- Chandy, K.G.; Cahalan, M.; Pennington, M.; Norton, R.; Wulff, H. & GUTMAN, G.A. (2001). Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. *Toxicon*. **39**: 1269-1276.
- Oliveira, J. S.; Redaelli, E.; Zaharenko, A. J.; Cassulini, R. R.; Konno, K.; Curia, G.; Pimenta, D.C.; Freitas, J. C.; Clare, J. J. & Wanke, E. (2004). Binding of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 Sodium Channels: Unexpected Contributions from Differences in the IV/ S3-S4 Outer Loop. *Journal of Biological Chemistry*. ARTIGO ACEITO, EM PUBLICAÇÃO.

ROTEIRO DE AULA PRÁTICA

André Junqueira Zaharenko

Laboratório de Produtos Naturais Marinhos

Durante a aula prática, os alunos acompanharão procedimentos de fracionamento de peçonhas totais pela técnica cromatográfica de gel-filtração. Basicamente, a metodologia consistirá conforme descrito abaixo:

Purificação da peçonha por gel-filtração em gel de Sephadex G-50 e estimativa do conteúdo protéico:

O fracionamento da peçonha liofilizada de anêmona será realizado através de uma coluna (1,9cm X 131cm) empacotada com gel Sephadex G-50 (Pharmacia LKB- Biotechnology, Uppsala, Sweden), para se obter as frações neurotóxicas e hemolíticas já detectadas neste tipo de fracionamento. A peçonha previamente centrifugada e liofilizada (cerca de 1-2g de material seco; 200mg de proteína) será dissolvida em 10-20mL de tampão acetato de amônio 0,1M, pH 7,0 e aplicada ao topo da coluna, equilibrada e eluída por gravidade com o mesmo tampão. Cerca de 60 frações de 10mL cada uma foram coletadas, agrupadas e liofilizadas.

A absorbância de cada fração, uma medida relativa da quantidade de proteína contida em cada uma, será registrada diretamente na saída da coluna, através da passagem do efluente por um detector de UV (Spectra/ Chrom™ Flow Thru UV Monitor com unidade óptica de 280nm e UV Monitor Controller, Spectrum, Austria) antes de entrar no coletor de frações. A informação, captada pelo detector, é integrada e registrada permanentemente em papel (Spectra/ Chrom TM 1 Channel Recorder, Spectrum, Áustria). O registro direto na saída da coluna permite o acompanhamento constante do processo de filtração em gel, desta maneira, otimizando o processo de coleta.

Para estimar-se a quantidade de proteína presente na peçonha e nas frações obtidas, durante esta etapa e nas subseqüentes, será empregado um "kit" que se baseia no método de dosagem do ácido bicinonínico (BCA) seguindo-se o protocolo do manual do fabricante (Pierce, Rockford, USA). Utiliza-se albumina sérica bovina como padrão.

Purificação por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) da fração neurotóxica (FR III):

Esta etapa será realizada no Laboratório Especial de Espectrometria de Massa (LEEM) do Centro de Toxinologia Aplicada (CAT/CEPID- FAPESP) do Instituto Butantan.

O conjunto da fração neurotóxica (FR III) obtida de cromatografias por filtração em gel vai ser ressuspendido em água Milli-Q (Millipore Inc.) e injetado em um sistema de purificação Shimadzu de HPLC constituído por um detector UV-VIS SPD-10A VP, bombas LC-10AD VP e um sistema controlador SCL-10A VP (Shimadzu Corp., Japan). As amostras são então cromatografadas em uma coluna C-18 de fase reversa ODS (4.6 x 150 mm, 5µm; Hi-Q™) com um gradiente linear de 10 a 60% do solvente "B" composto de acetonitrila + 0,1% de ácido trifluoroacético (CH₃CN / 0,1%TFA) com fluxo de 1,0 mL/min durante 40min, através de monitoramento em UV 214 nm. O solvente "A" é composto de 0,1% de TFA em água Milli-Q.

Todos os picos obtidos são coletados manualmente e individualmente ou agrupados em frações para serem posteriormente submetidos à espectrometria de massa e ensaios biológicos.

Monitoramento de atividade neurotóxica das amostras em nervo sensorial de crustáceo. Técnica de “sucrose-gap”:

A preparação será realizada utilizando-se nervos sensoriais de crustáceos decápodos braquiúros da espécie *Callinectes danae* (siri azul), coletados no canal de São Sebastião. Testaremos o efeito de neurotoxinas isoladas de peçonhas de anêmonas sobre o potencial de ação axonal de nervo de siri.

O procedimento consiste na separação do 2º ou 3º par de patas provocando-se autotomia por compressão do artigo proximal (base-isquio). Como o nervo ocupa uma posição aproximadamente central no pereiópodo, o mesmo é exposto até o dátilo, removendo-se um a um os artigos por secção das membranas artrodiais, apódemas musculares e separação dos côndilos articulares.

Técnica de “sucrose-gap” - Essa técnica consiste no isolamento elétrico de uma área superficial do nervo, na região entre os eletrodos de registro, através de lavagens sucessivas com uma solução de sacarose 1M. São feitas 10 lavagens com sacarose a fim de remover íons da superfície do nervo, deixando a área eletricamente isolada, impedindo a passagem de corrente na superfície do nervo. O potencial de membrana pode ser medido de uma câmara contendo KCl para outra com salina. Assim, eletrodos antes e após a barreira de sacarose registram tanto a voltagem produzida pela corrente iônica que passa através da membrana e no interior das fibras nervosas durante o potencial de ação, como o potencial de repouso. A câmara de acrílico que é utilizada no experimento para estimulação e registro dos potenciais de ação contém 8 sulcos escavados, unidos centralmente por um sulco onde se encontra apoiado o nervo e, para isolar um sulco do outro adiciona-se vaselina. Os eletrodos de estimulação se encontram nos sulcos 1 (positivo) e 2 (negativo), enquanto que os de registro nos sulcos 5 e 8, separados por dois sulcos contendo sacarose 1M para isolamento. Os cinco primeiros sulcos são preenchidos com solução fisiológica de *C. danae* e o último com solução de KCl isosmótica (0,46M). Para amplificação dos sinais obtidos utilizamos um pré-amplificador modelo CP511AC (Grass Instruments Co., Warwick, USA). Os dados serão adquiridos através de um microcomputador tipo PC e processados através do programa WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Glasgow, UK <http://www.strath.ac.uk/Departments/PhysPharm/ses.htm>).

A DEPRESSÃO METABÓLICA NOS ANIMAIS

Laura Saade Haddad

Laboratório de Metabolismo Energético e Adaptabilidade

Existem diversos fatores que limitam a existência e sobrevivência de um organismo na natureza, podendo ser bióticos, como a falta de recursos alimentares, relações intra-específicas, competição interespecíficas, etc..., ou abióticos, os quais incluem fatores climáticos como calor, luz, umidade, interações entre temperatura e umidade, oxigênio, e outros. Frente a modificações nestes fatores, como quedas de temperatura, calor intenso, seca, escassez de oxigênio e hipersalinidade, os animais podem reagir de três formas:

- 1- Migrar para um ambiente mais favorável
- 2- Enfrentar estas condições ativamente
- 3- Evitá-las mantendo-se inativos até o retorno a condições mais amenas.

Na maioria dos casos, estas mudanças nos fatores abióticos estão associadas à escassez de recursos alimentares, assim muitos animais adotaram a estratégia de evitar tais obstáculos à sobrevivência entrando em **depressão metabólica**, na qual podem permanecer em jejum e inativos por períodos prolongados e com uma drástica redução no consumo de energia, ou seja, na taxa metabólica.

A depressão metabólica é uma redução da taxa metabólica padrão ou de repouso para níveis ainda inferiores podendo variar entre uma redução de 60 a 99%, o que estende o tempo de sobrevivência de um indivíduo quando as condições ambientais são desfavoráveis, sendo a sobrevivência de um organismo diretamente relacionada com o grau de depressão metabólica alcançado. Este estado já foi relatado nos principais filos animais, de invertebrados a todas as classes de vertebrados e é caracterizado por uma redução geral da atividade: os movimentos cessam, a alimentação e digestão param, a frequência cardíaca e respiratória diminuem.

Existem diversos tipos de depressão metabólica, como a **estivação**, que está associada ao período de seca, a **anaerobiose facultativa** a diminuição no teor de oxigênio e a **hibernação** ao frio invernal.

Na tabela 1 temos diversos exemplos de animais e alguns tipos de depressão metabólica:

Fenômeno	Animal	% da taxa metabólica de repouso
Estivação	Lesma terrestre	10-30
	Sapo/rã do deserto	17-30
	Peixe pulmonado	10-20
Anaerobiose facultativa	Molusco marinho	5-10
	Tartaruga de água doce	5-20
	Camundongo	1.5-3
Hibernação	Morcego	1-4
	Esquilo terrícola	4-8

Existem também animais que realizam uma depressão metabólica diária (torpor diário), mas este fenômeno está fortemente associado à economia de energia durante o período de repouso, tendo em vista que estes animais tem um consumo energético bastante elevado durante o período de atividade. É o caso de algumas aves e mamíferos pequenos, como beija-flores e morcegos, respectivamente.

Dentre os animais capazes de reduzir tão drasticamente seu metabolismo, alguns podem fazê-lo perante uma condição adversa repentina, inesperada, como a seca numa época do ano em que isto não é freqüente (encistamento em *Artemia*). Outros exibem uma dormência sazonal, ou seja, o fenômeno de depressão metabólica se repete com periodicidade, ano após ano, em determinada estação. Nestes casos, a depressão metabólica é intrínseca, ou seja, o animal se antecipa à condição ambiental desfavorável, ingere grandes quantidades de alimento, geralmente sob a forma de lípidos, e prepara todo o maquinário enzimático para a entrada em hipometabolismo. Mesmo quando mantidos em laboratório e com comida disponibilizada ad libitum estes indivíduos recusam o alimento durante a dormência, denunciando o caráter intrínseco do fenômeno.



Esquilo do Ártico hibernando



Lesmas *Otala lactea* estivando



O sapo *Scaphiopus couchii* saindo da estivação

Nesta aula serão abordados com maior profundidade os ajustes metabólicos dos animais para a entrada e saída da depressão metabólica sazonal, bem como a regulação deste fenômeno.

Referências bibliográficas de apoio:**1-Para uma visão geral do fenômeno de depressão metabólica:**

- Guppy, M., Fuery, C.J. and Flanigan, J.E. (1994). Biochemical Principles of metabolic depression. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B. 175-189.
- Guppy, M. and Withers, P. 1990. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol. Rev.* 74: 1-40.
- Schmidt-Nielsen, K. (1996). *Fisiologia Animal: Adaptação e meio Ambiente*. 6ed. Editora e Livraria Santos, São Paulo. P276-282.

2- A depressão metabólica em diferentes animais:

- Hailey, A. and Loveridge, J. P. (1996). Metabolic depression during dormancy in the African tortoise *Kinixys spekii*. *Can.J.Zool.* 75:1328-1355.
- Storey, K.B. (2002). Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comp. Biochem. Physiol.* 133, 733-754.
- Souza, S.C.R., Carvalho, J.E., Abe, A.S. Bicudo, J.E. P.W. and Bianconcini, M. S. C. (2004). Seasonal metabolic depression, substrate utilization and changes in scaling patterns during the first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis merrianae*). *J. Exp. Biol.* 207: 307-318.

3-Para uma revisão sobre a regulação da depressão metabólica:

- Storey, K. B. and Storey, J.M. (2004). Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls.
- Boyer, B.B. and Barnes, B.M. Molecular aspects of mammalian hibernation. *BioScience* Vol. 49 No. 9 pp. 713-724

4-Para uma revisão geral sobre bioquímica:

- Nelson, D.L., Cox, M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd edition; Worth Publishers: New York, N.Y.

TERMORREGULAÇÃO EM INSETOS

Denise Loli

Laboratório de Metabolismo Energético e Adaptabilidade

PARTE 1 – INTRODUÇÃO - TERMORREGULAÇÃO NOS INSETOS EM GERAL

A maioria dos insetos torna-se progressivamente lenta e incapaz de voar a baixas temperaturas. Porém, alguns insetos conseguem aquecer seus músculos de vôo e ficar ativos mesmo em ar muito frio (Schmidt-Nielsen, 2002). Tais insetos apresentam assim endotermia e são capazes de realizar regulação da temperatura corpórea em uma larga faixa de temperaturas ambiente. A maioria desses animais regula a temperatura torácica mas não a temperatura abdominal (Withers, 1992). O aquecimento dos músculos do vôo, no tórax, antes da decolagem, ocorre, principalmente, em grandes insetos, como gafanhotos, grandes mariposas, borboletas, mamangavas, vespas e abelhas, que apresentam vôo com alta potência mecânica (Schmidt-Nielsen, 2002).

Há muito tempo se conhece a endotermia em insetos. Em 1837, 6 anos após o início do uso de termopares na medição da temperatura corpórea em insetos por Nobili & Meloni (1831 *apud* Heinrich, 1974), Newport (1837 *apud* Heinrich, 1974)) relatou que as mariposas e mamangavas podem elevar a sua temperatura torácica acima da temperatura ambiente por meio de atividade muscular. O aquecimento pré-vôo foi descrito por Dotterweich (1928 *apud* Heinrich, 1974) e, em 1965, Heath & Adams (1965 *apud* Heinrich, 1974) mostraram que a mariposa *Celerio lineata* estabiliza sua temperatura torácica durante o vôo em uma larga faixa de temperaturas do ambiente. Desde então, vários aspectos da termorregulação em insetos e outros animais foram estudados e revisados.

Para ilustrar as diferentes estratégias fisiológicas, anatômicas e comportamentais de termorregulação, usaremos como exemplo o caso das abelhas, que são insetos sociais que realizam termorregulação individual e colonial.

PARTE 2 - CASO ESPECÍFICO: ABELHAS

Em abelhas em repouso, suas temperaturas corpóreas são próximas às temperaturas ambientais, porém, quando as abelhas saem para o forrageamento (vôo para coleta de néctar, pólen, resina, barro etc) ou quando incubam sua cria, são capazes de regular as temperaturas corpóreas por meio de produção interna de calor. Dessa forma, a temperatura do corpo é mantida constante e independente da temperatura ambiente. Assim, as abelhas são denominadas insetos endotérmicos-heterotérmicos ou endotérmicos facultativos (Heinrich & Esch, 1994)

A termorregulação possibilita:

- o vôo em baixas temperaturas (as abelhas realizam aquecimento pré-vôo)
- defesa contra predadores (há casos de abelhas que “torram” predadores capturados por elas)

- incubar a cria (possibilitando condições adequadas para o desenvolvimento das larvas e pupas e criando um microhabitat adequado para a colônia como um todo [termorregulação colonial])
- vantagem competitiva (insetos que conseguem procurar recursos em horários diferentes de seus competidores)

Vantagens do comportamento de termorregulação em abelhas:

- propiciou o desenvolvimento de uma vida social
- propiciou a conquista de diferentes ambientes, como os desertos, as florestas tropicais, o ártico etc (Michener, 1974; Heinrich & Esch, 1994)

PARTE 2.1. - TERMORREGULAÇÃO INDIVIDUAL

Serão discutidos os mecanismos endógenos de produção de calor e os diversos fatores que influenciam na termorregulação.

Mecanismos endógenos de produção de calor

A forma mais comum de geração de calor no músculo é o tremor muscular, que envolve o funcionamento controlado de ATPases do sistema contrátil muscular (Hochachka & Somero, 1984). A termogênese por tremor muscular é comum em mamíferos, aves e em alguns insetos, sendo aparentemente uma resposta generalizada dos endotermos ao frio.

Uma segunda maneira de aumentar a liberação metabólica de calor envolve os processos que resultam em termogênese por não tremor. A termogênese por não tremor é relatada em mamíferos placentários, alguns marsupiais e poucas aves (Withers, 1992). Os processos envolvidos englobam aqueles de liberação de calor como aqueles gerados por ciclos fúteis e aqueles originados do metabolismo do tecido adiposo marrom (TAM) de mamíferos. Heinrich (1993) apresenta ampla revisão sobre as estratégias e mecanismos de termorregulação em insetos. Belzunces *et al* (1996) investigaram os efeitos de compostos adrenérgicos na termorregulação de abelhas melíferas mantidas a 22°C e com temperatura torácica monitorada por infravermelho. Segundo esses autores, um mecanismo do tipo beta-adrenérgico parece estar envolvido na termorregulação de abelhas melíferas e particularmente na termogênese.

O sistema circulatório é ineficiente para as trocas gasosas, entretanto auxilia na retenção de calor no tórax, por meio de mecanismo de contracorrente (Heinrich & Esch, 1994).

Outros fatores influenciando a termorregulação

Além dos mecanismos endógenos, há também outros fatores que influenciam a termorregulação das abelhas, como:

- pilosidade
- cor
- tamanho corpóreo
- sexo
- hábito de vida

PARTE 2.2. - TERMORREGULAÇÃO COLONIAL EM INSETOS SOCIAIS

O desenvolvimento das larvas e das pupas (a “cria”) é favorecido se a temperatura do favo da colônia for relativamente constante e independente da temperatura ambiente. Essas condições favoráveis dentro da colméia podem ser devido a estruturas internas e externas do ninho, do local onde o ninho está alojado e da fisiologia das abelhas (termorregulação) (Michener, 1974; Engels et al, 1995).

Considerando as abelhas, diversos grupos realizam termorregulação colonial, como as abelhas melíferas do gênero *Apis*, as mamangavas (*Bombus*) e as abelhas nativas sem ferrão (por exemplo os meliponíneos). Este tópico será discutido e apresentado na forma de diversos exemplos.

PARTE 3 - TÓPICO DE DISCUSSÃO

Evolução da endotermia

Bibliografia:

- Belzunces, L.P.; Vandame, R. & Gu, X. (1996) Modulation of honey bee thermoregulation by adrenergic compounds. *Neuroreport* **7(10)**:1601-4.
- Dotterweich, H. (1928) *Zool Physiol Tiere* 44: 399 *apud* Heinrich, B. (1974) Thermoregulation in endothermic insects. *Science* **185**: 747-56.
- Engels, W.; Rosenkrantz, P. & Engels, E. (1995) Thermoregulation in the nest of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona postica* and the hypothesis on the evolution of temperature homeostasis in highly eocial bees. *Studies on Neotropical fauna and Environment* **30(4)**:193-204.
- Heath, J.E. & Adams, P.A (1965) *Nature* 205: 309 *apud* Heinrich, B. (1974) Thermoregulation in endothermic insects. *Science* **185**: 747-56.
- Heinrich, B. (1974) Thermoregulation in endothermic insects. *Science* **185**: 747-56.
- Heinrich, B. (1993) *The Hot-Blooded Insects*. Cambridge, MA. Harvard University Press.
- Heinrich, B. & Esch, H. (1994) Thermoregulation in bees. *American Scientist* **82**:164-170.
- Hochachka, P.W. & Somero, G.N (1984) *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press.
- Michener, C.D. (1974) *The social behavior of the bees*. Cambridge. Belnap Press of Harvard University Press, 404p.
- Newport, G (1837) *Philos Trans R Soc Lond* 127(2): 259 *apud* Heinrich, B (1974) Thermoregulation in endothermic insects. *Science* **185**: 747-56.
- Nobili & Meloni (1831) *Ann Phys Chim* 48: 198 *apud* Heinrich, B (1974) Thermoregulation in endothermic insects. *Science* **185**: 747-56.
- Schmidt-Nielsen, K. (2002) *Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente*. Santos Livraria Editora, São Paulo.
- Withers, P.C. (1977) Measurement of VO₂, VCO₂ and evaporative water loss with a flow through mask. *J Appl Physiol* **42(1)**: 120-3.
- Withers, P.C. (1992) *Comparative animal physiology*. Saunders College Publishing, USA.

Sites interessantes:

- http://zool33.uni-graz.at/schmickl/Self-organization/Thermoregulation/Bee_thermoregulation/bee_thermoregulation.html
- <http://www.beekeeping.com/>
- http://www.hup.harvard.edu/reviews/HEITHE_R.html
- <http://www.webbee.org.br/>

A *Rana* E O RATO: UM ESTUDO COMPARATIVO DAS CAPACIDADES METABÓLICAS EM TECIDOS MUSCULARES DE DUAS ESPÉCIES DE VERTEBRADOS

José Eduardo de Carvalho
Laboratório de Ecofisiologia e Fisiologia Evolutiva

1. INTRODUÇÃO

Os estudos comparativos nos oferecem uma valiosa ferramenta para se entender de forma integrada como certas características fisiológicas são modificadas em resposta às mudanças que surgem ao longo da escala evolutiva. Eles nos permitem ainda compreender como, por exemplo, as diferenças comportamentais estão correlacionadas com as características fisiológicas que dão suporte aos padrões típicos de atividade em diversos organismos. Se focarmos as modificações que ocorrem em nível celular podemos identificar diferentes alvos que estão sujeitos a modificações na capacidade de ciclagem de energia que, em última, estarão relacionadas com a capacidade para a atividade. Dentre as principais alterações podemos destacar os ajustes (1) na concentração de estoques energéticos intracelulares, (2) na proporção e tamanho das fibras musculares, (3) na capacidade tamponante dos músculos, (4) na quantidade de mitocôndrias e (5) nos níveis e tipos de enzimas das vias glicolítica e aeróbia. Dessa forma, analisar de modo comparativo os processos metabólicos relacionados com a manutenção da homeostase energética nos tecidos musculares contribui para o entendimento das relações entre a fisiologia e o desempenho. Nesta aula realizaremos um estudo comparativo simples entre as atividades máximas das enzimas lactato desidrogenase (LDH) da via glicolítica, e da citrato sintase (CS) do Ciclo de Krebs, em amostras em um tecido muscular do rato e da rã. Ao final, faremos uma discussão sobre os principais achados.

2. ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Material Biológico

Utilizaremos a porção vermelha do músculo *gastrocnemius* do rato e da rã. Todas as soluções serão fornecidas já preparadas; entretanto, suas composições são apresentadas no final do texto.

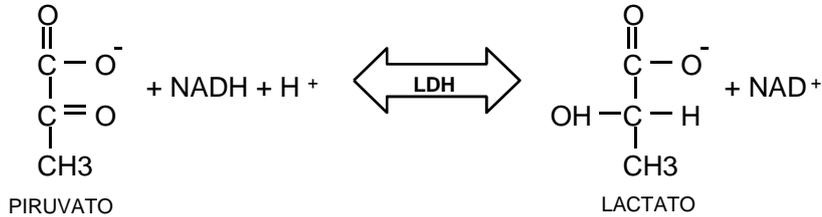
Preparação das Amostras

Pese cerca de 100mg de cada músculo e retalhe o tecido com uma tesoura, tomando-se o cuidado de mantê-los sobre gelo. Adicione os fragmentos no tubo de homogeneização e acrescente 9 volumes de "*tampão de homogeneização*" gelado (multiplique a massa de tecido pesado em gramas por 9 para ter o volume de tampão a ser pipetado em mL). Homogeneize a mistura no Ultra Turrax (Ika Labor Technik) a 20.000 rpm, mantendo-se o tubo sob gelo. A seguir, introduza o sonotrodo do sonicador U-200S control (Ika Labor Technik) na solução homogeneizada e ligue o aparelho 3 vezes por 10 segundos, com intervalos de 10 segundos entre cada vez, na amplitude de 50% e ciclo de 0,5. Este procedimento deverá romper todas as membranas celulares e mitocôndriais, liberando para a solução as enzimas compartimentalizadas. Prepare dois frascos para uma diluição adicional de cada amostra de tecido. Dilua a amostra em 1:10 vezes (este extrato será utilizado na medida da atividade

da LDH) e 1:5 vezes (este extrato será utilizado na medida da atividade da CS) utilizando o "tampão de homogeneização".

Medida da Atividade Máxima da LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

A enzima LDH é a responsável pela seguinte reação:



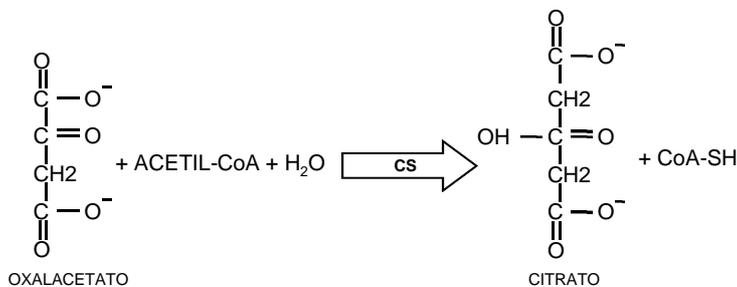
A atividade da LDH será medida por espectrofotometria, a 25°C, através do monitoramento contínuo das alterações de absorbância, a 340nm, dada pela oxidação do NADH quando o piruvato é consumido. Para isso, misture as soluções identificadas no protocolo abaixo:

solução	volume a pipetar na cubeta (µL)	[final no ensaio] (mM)
<i>Imidazol – HCl - 50mM (pH 7,0)</i>	880	50
<i>DTT – 100mM</i>	50	5
<i>NADH – 15mM</i>	10	0,15
<i>Amostra diluída 1:10</i>	10	
<i>Misturar, esperar atingir 25°C e ler a absorbância por 3 minutos a 340nm ⇨</i>		
<i>Piruvato – 40mM</i>	50	2
<i>Misturar e ler a absorbância por 3 minutos a 340nm ⇨ EXPERIMENTAL</i>		

Anote os valores de variação de absorbância por minuto da reação após a adição de piruvato, descontadas as variações observadas na reação controle.

Medida da Atividade Máxima da CITRATO SINTASE (CS)

A enzima CS é a responsável pela seguinte reação:



A quantidade de oxalacetato usado por unidade de tempo é uma medida da atividade catalítica da CS. O uso de oxalacetato será medido em espectrofotômetro, a 25°C, pelo aumento da absorbância a 412nm, devido à produção de coenzima-A ligada ao DTNB. Para isso, misture as soluções identificadas no protocolo abaixo:

solução	volume a pipetar na cubeta (µL)	[final no ensaio] (mM)
<i>Tris – HCl - 50mM (pH 8,0)</i>	885	50
<i>Acetil-CoA – 3mM</i>	100	0,3
<i>DTNB – 1mM</i>	100	0,1
<i>Amostra diluída 1:5</i>	20	
<i>Misturar, esperar atingir 25°C e ler a absorbância por 3 minutos a 412nm ⇨</i>		
<i>Oxalacetato – 20mM</i>	25	0,5
<i>Misturar e ler a absorbância por 3 minutos a 412nm ⇨ EXPERIMENTAL</i>		

Anote os valores de variação de absorbância por minuto da reação após a adição de oxalacetato, descontadas as variações observadas na reação controle.

Cálculos

A atividade enzimática é usualmente expressa em *unidades de atividade enzimática* (U) por grama de tecido fresco. A unidade U representa a quantidade, em micromoles, de substrato convertido em produto por minuto na solução ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$). Para o cálculo da atividade enzimática nas condições do ensaio devemos utilizar a seguinte equação:

$$U \cdot \text{g}_{\text{tecido fresco}}^{-1} = \frac{(\Delta\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1}) \times V}{\epsilon \times d \times v \times \rho_{\text{amostra}}} = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{tecido fresco}}^{-1}$$

onde:

ΔAbs = alteração de absorbância por minuto

d = distância percorrida pela luz na solução (mm)

V = volume do ensaio (L)

v = volume da amostra no ensaio (L)

ϵ = coeficiente de absorção molar ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$)

ρ_{amostra} = concentração de massa da amostra ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

As unidades são expressas no sistema SI (Sistema Internacional de Unidades).

O coeficiente ϵ para o NADH é igual a $6,22 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ e a distância $d = 10\text{mm}$.

Para propósitos práticos, usamos a concentração da substância em $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (= $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$). Então, para o NADH, $\epsilon \times d = 6,22 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1}$ (= $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$). Para o DTNB, a 412nm, essa mesma relação é equivalente a 13,6. A razão V / v nos informa, em outras palavras, qual é a diluição da amostra no ensaio. Já a concentração de massa da amostra (ρ_{amostra}) representa a diluição feita na homogeneização. Como os tecidos de um modo geral apresentam cerca de 80% de água, normalmente é aceito que 1g de tecido equivale a 1mL. Assim, podemos simplificar a equação acima para facilitar o cálculo de atividade enzimática:

$$U \cdot g_{\text{tecido fresco}}^{-1} = \frac{(\Delta \text{Abs} \cdot \text{min}^{-1})}{6,22 \text{ (se usado o NADH)} \text{ ou } 13,6 \text{ (se usado o DTNB)}} \times \text{diluição no ensaio} \times \text{diluição na homogeneização}$$

...lembrando ainda que foi feita uma diluição extra da amostra (1:10 para a medida da atividade da LDH e 1:5 para a medida da atividade da CS), e esta deve ser levada em conta neste momento multiplicado-se o valor desta no resultado final.

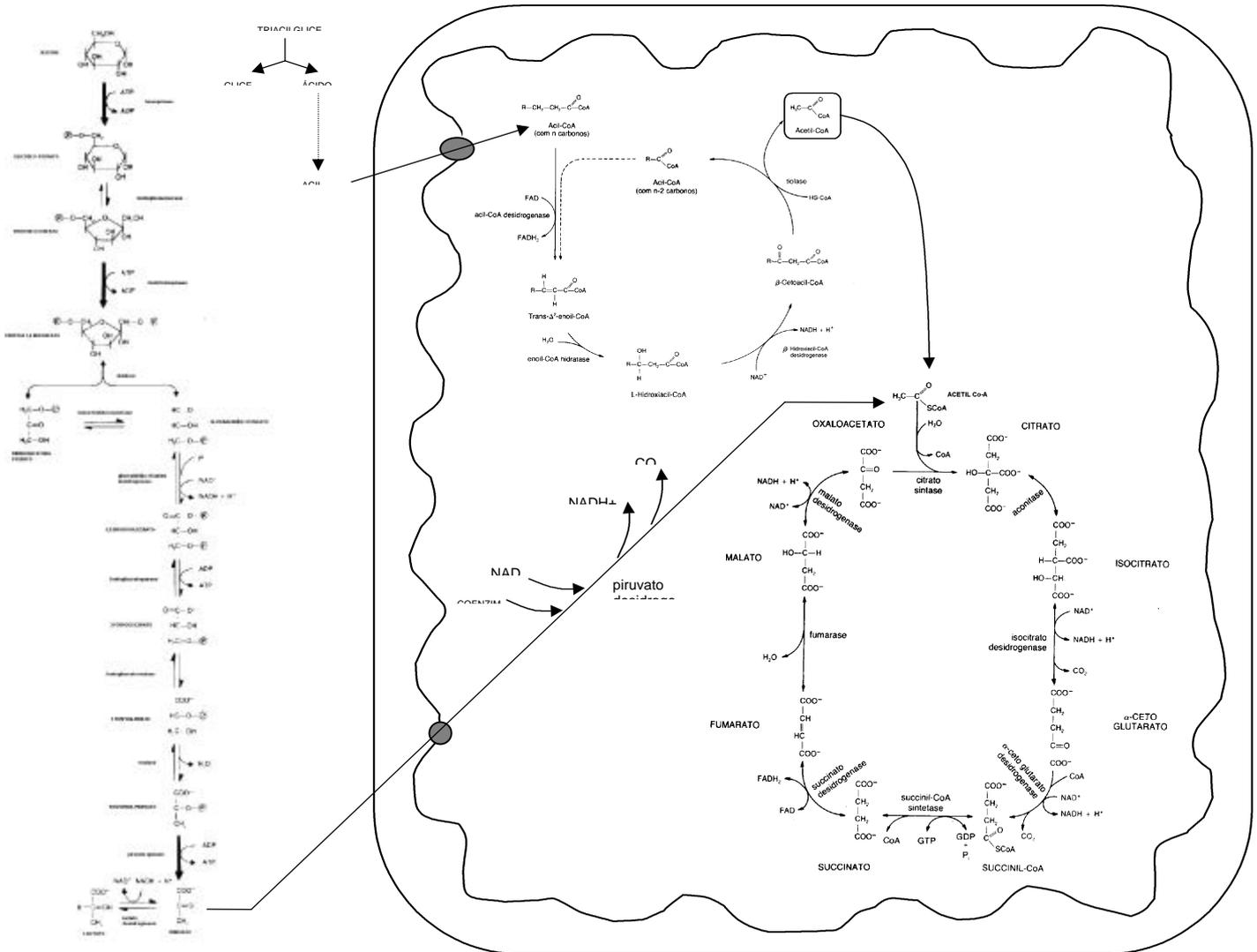
Assim, utilize a equação acima para calcular a atividade das enzimas LDH e CS nos tecidos musculares do rato e da rã. Anote os resultados obtidos e guarde-os com carinho.

3. AGORA PENSE NISSO...

1. Que tipo de informação é possível obtermos com a análise da atividade máxima das enzimas LDH e CS e por que estas enzimas foram estrategicamente escolhidas para este estudo ?
2. Baseado neste estudo, quais seriam suas explicações para as diferenças encontradas entre o rato e rã ?
3. O que devemos levar em consideração quando comparamos o rato e a rã durante o desempenho desses animais na atividade locomotora ?
4. Ao final dessa aula, quais as principais conclusões que você pode extrair desse tipo de estudo comparativo ? É possível pensar em adaptação neste nível de abordagem ?

4. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Esquema das Principais Vias Metabólicas Energéticas no Músculo de Vertebrados



Composição do Tampão de Homogeneização

Imidazol – 20mM; PMSF – 1mM; EDTA – 2mM; NaF – 20mM e Triton X-100 – 0,1% (pH 7.4)

Abreviações da soluções

DTT: Ditiotretio

DTNB: Ácido Dithionitrobenzóico

NADH: Nicotinamida Adenina dinucleotídeo, forma reduzida

PMSF: Fenilmetilsulfonyl fosfato

5. SUGESTÕES DE LEITURA

Metodologia

- Bergmeyer, H.U. (1983) **Methods of Enzymatic Analysis, vol 2. Enzymes**. Verlag Chemic, Wheinheim.
- Passonneau, J.V and Lowry (1993). **Enzymatic Analysis: a practical guide**. Humana Press, Totowa, N.J.

Teoria

- Bevier, C.R. (1995) Biochemical correlates of calling activity in neotropical frogs. *Physiol. Zool.* **66**: 1118-1142.
- Gleeson, T.T. (1991) Patterns of metabolic recovery from exercise in amphibians and reptiles. *J. Exp. Biol.* **160**: 187-207.
- Gleeson, T.T. (1996) Post-exercise lactate metabolism: a comparative review of sites, pathways and regulation. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 565-581.
- Hochachka, P.W. (1994) **Muscles as Molecular and Metabolic Machines**. CRC Press, Inc.
- Hochachka, P.W. & Somero, G.N. (2002) **Biochemical Adaptation. Mechanism and Process in Physiological Evolution**. Oxford Univ. Press, New York.
- McNab, B.K. (2002) **The Physiological Ecology of Vertebrates. A View from Energetics**. Cornell Univ. Press, New York.
- Kemper, W.F.; Lindstedt, S.L.; Hartzler, L.K.; Hicks, J.W. & Conley, K.E. (2001) Shaking up glycolysis: sustained, high lactate flux during aerobic rattling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 723-728.
- Pough, F.H.; Magnusson, W.E., Ryan, M.J. Wells, K.D. and Taigen, T.L. (1992) **Behavioral energetics**. In: Ferder, M.E. and Burggren, W.M. (eds.) *Environmental Physiology of the Amphibians*. The Univ. Chicago Press. Chicago. pg: 395-436.
- Suarez, R. K. (1996) Upper-limits to mass-specific metabolic rates. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 583-605
- Suarez, R.K. (1998) Oxygen and the upper limits to animal design and performance. *J. Exp. Biol.* **201**: 1065-1072.
- Wells, K.D. (2001) **The Energetics of Calling in Frogs**. In: Ryan, M.J. (ed.). *Anuran Communication*. Smithsonian Inst. Press. Washington.

ECOFISIOLOGIA DE LAGARTOS

Renata Brandt Nunes
Laboratório de Ecofisiologia e Fisiologia Evolutiva

A ecofisiologia pode ser interpretada como o estudo de como os organismos funcionam e respondem a mudanças em seus ambientes naturais. Neste contexto, a aula tratará principalmente das implicações fisiológicas das mudanças de temperatura nos Squamata, com ênfase nos lagartos, pois é bastante profunda a influência deste fator na vida destes animais. Será importante recordar a terminologia relacionada à regulação da temperatura, como os conceitos de endotermo e ectotermo assim como pecilotermo e homeotermo; e ainda heliatermos, tigmotermos; a diferença entre ser termorregulador e termoconformador; o que é a temperatura preferencial e conceitos relacionados aos limites de temperatura de atividade.

A aula em si será baseada na discussão sobre os mecanismos morfológicos e fisiológicos da termorregulação e a relação com aspectos da história natural dos lagartos no contexto metabólico e dependente de temperatura, como distribuição e seleção de microhabitat; atividade diária e sazonal; comportamento; alimentação, digestão e dieta; reprodução; infecção e balanço hídrico.

Sugestões de Leitura

- Bennet, A.F. (1980). The thermal dependence of lizard behaviour. *Animal Behaviour*, **28**: 752-762.
- Deeming, D.C. & Fergusson, M.W.J. (1991). Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. In **Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles**, eds D. C. Deeming & M. W. J. Fergusson, 147-171. Cambridge: Cambridge University Press.
- Espinoza, R.E. & Tracy, C.R. (1997). Thermal biology, metabolism and hibernation. In: **The biology, husbandry and health care of reptiles**. Ackerman LJ ed. Volume 1, Biology of Reptiles. T.F.H. Publication, Neptune City, NJ.
- Huey, R.B. (1982). Temperature, Physiology, and the Ecology of Reptiles. In: **Biology of the Reptilia** vol 12. Gans C. *et al.* eds, Academic Press.
- McNab, B.K. (2002). **The Physiological Ecology of Vertebrates: a view from energetics**. Cornell University Press.
- Packard, G.C. (1991). The physiological and ecological importance of water to embryos of oviparous reptiles. In **Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles**, eds D. C. Deeming & M. W. J. Fergusson, 213-228. Cambridge: Cambridge University Press
- Pough, F.H. (1980). **The advantages of ectothermy for tetrapods**. *American Naturalist* 115:92-112.
- Pough, F.H. & Gans, C. (1982). The vocabulary of reptilian termorregulation. In **Biology of the Reptilia** vol 12. Gans C. *et al.* eds, Academic Press.
- Pough, H.F.; Andrews, R.M.; Cadle, J.E.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H. & Wells, K.D. (1998). **Herpetology**. New Jersey: Prentice – Hall, Inc.

Links Interessantes

Páginas de pesquisadores, com informações sobre as linhas de pesquisa e links para outras páginas de herpetologia.

<http://rydberg.biology.colostate.edu/faculty/profile.php?name=Packard>

<http://lamar.colostate.edu/~packard/> – **Gary Packard**

<http://faculty.washington.edu/hueyrb/index.html> - Laboratory of Evolutionary Physiology, dirigido por **Raymond B. Huey**. Dispõe ainda de conselhos para estudantes de pós-graduação ou interessados em fazer pós-graduação

<http://uts.cc.utexas.edu/~varanus/> - Pianka's Lab Page. Página do Laboratório do **Eric Pianka**.

<http://www.omnh.ou.edu/personnel/herpetology/vitt/> - **Laurie J. Vitt**

<http://compphys.bio.uci.edu/bennett/bennett.htm> – **Albert F. Bennet**

<http://oeb.indstate.edu/faculty/Angilletta.htm> – **Michael J. Angilletta Jr.**

Cursos de Ecofisiologia na Internet

<http://wildlife.wisc.edu/courses/401/> - University of Wisconsin – Madison

<http://www.eeb.uconn.edu/courses/eeb296/> - University of Connecticut

<http://bioweb.wku.edu/faculty/Crawford/526.html> – Western Kentucky University

Informações gerais sobre lagartos

<http://tolweb.org/tree?group=Diapsida&contgroup=Amniota> – **Tree of Life**, com cladogramas e discussões sobre filogenia de todos os grupos de seres vivos. Este link direciona para o grupo dos diapsida.

<http://www.ucmp.berkeley.edu/diapsids/diapsids.html> – **UCPM Berkeley**, cladogramas e todo tipo de informação biológica (incluindo fósseis) sobre a diversidade da vida, este link direciona para o grupo dos diapsida

COMPORTAMENTO E FISIOLOGIA DE FORMIGAS *Atta*

Pedro Ribeiro

Laboratório de Ecofisiologia e Fisiologia Evolutiva

As sociedades dos insetos são conhecidas por se constituírem de indivíduos especializados em diferentes tarefas. Em certas espécies de formigas, esta especialização está relacionada com o aparecimento de diferenças surpreendentes no tamanho entre indivíduos de uma mesma colônia, geralmente associadas a tarefas diferentes (Bonabeu, 1997). Temos, por exemplo, em colônias do gênero *Atta* formigas cuja largura da cápsula cefálica pode variar de 0,8mm até 3,0mm. Simplificando, podemos subdividir estes diferentes tamanhos em quatro grupos, de acordo com suas funções. Assim, temos as jardineiras e “babás” que são as menores operárias da colônia e têm a função de cuidar das hifas e das formas imaturas. Já as generalistas, de cápsula cefálica com aproximadamente 1,4mm são responsáveis por vários tipos de atividades dentro do ninho, como a preparação de vegetais, que deve ser feita antes da incorporação dos mesmos à esponja, descarte de lixo e reconstrução das esponjas de fungo. Temos ainda a não menos importante casta das forrageadoras com 2,2mm de cápsula cefálica, essas formigas exploram o meio externo ao ninho e são responsáveis pela coleta de vegetação. Por último, temos as defensoras ou soldados, com cápsula cefálica de 3,0mm, como o próprio nome sugere são elas as responsáveis pela defesa do ninho contra invasores, principalmente de outras formigas. (Adam e Ratnieks, 2001; Roces e Hölldobler, 1994; Andrade et al., 2002; Carvalho, 1972; Wilson, 1980; Wilson, 1971). A divisão de tarefas não é completamente rígida, sendo que a colaboração entre os indivíduos de diferentes castas propicia o surgimento de padrões de comportamentos característicos de um “superorganismo”, favorecendo a colônia de uma forma global (Hölldobler e Wilson 1984). A manutenção do equilíbrio homeostático de uma colônia requer uma rápida percepção de fatores desestabilizadores externos ou internos e uma comunicação que possibilite a reorganização na direção do equilíbrio.

Além da flexibilidade na troca de tarefas entre as diferentes castas de formigas operárias variações do meio ambiente promovem comportamentos que conduzem ao reequilíbrio do microambiente da colônia. Kleineidam e Roces em 2000, observaram em ninhos de formigas cortadeiras *Atta vollenweideri* diferentes comportamentos em função da idade da colônia. Os ninhos de colônias grandes, maduras, asseguram um bom micro-clima para o crescimento do fungo. Essas colônias constroem montes de terra ao redor das entradas do ninho cuja arquitetura promove a ventilação preservando a concentração de CO₂ em baixos níveis. Além disso, esses montes de terra impedem a entrada da enxurrada nos olheiros. As colônias jovens, pequenas e que ainda não construíram montículos protetores se vêem obrigadas a fecharem todas as saídas do ninho para protegê-lo do excesso de chuva. Quando fecham as entradas a concentração de CO₂ aumenta rapidamente, a taxa de respiração da colônia reduz-se, a respiração do fungo simbiótico também é reduzida e o crescimento da colônia fica comprometido. Contudo, através do fechamento, as operárias impedem a inundação e garantem a continuidade da colônia.

Freqüentemente a homeostase de uma colônia envolve processos complexos de comportamentos onde aspectos individuais e sociais interagem para suprir, com maiores benefícios, as necessidades energéticas da colônia (Roces, 2002). Em colônias de *Atta cephalotes*, a primeira formiga forrageadora que encontra uma nova fonte de alimento, corta um fragmento de folha bem menor do que cortaria numa situação de forrageamento bem estabelecida. Dessa forma, essa primeira formiga diminui o tempo de corte e chega mais rapidamente ao ninho onde passará as informações da fonte para suas irmãs. Assim, a coleta total para a colônia aumenta através do recrutamento embora a primeira forrageadora tenha prejudicado sua performance. Num primeiro momento, o recrutamento torna-se mais importante que a atividade individual de corte. Essa capacidade individual de distinguir as diferentes situações de forrageamento possibilita maior rapidez no reequilíbrio energético da colônia (Roces, 1993). A velocidade com que as operárias modificam seu comportamento em resposta aos estímulos externos varia de acordo com o tipo de comportamento e o contexto. O grau de flexibilidade pode variar com o tamanho e a idade da colônia, as operárias de colônias jovens parecem mais versáteis, mais flexíveis em suas tarefas, mas a colônia como um todo é menos homeostática. Uma vez que a proporção entre as castas é muito mais frágil em colônias jovens, e os mecanismos de suporte, como a mudança de tarefas não é 100% eficiente (Lenoir, 1979a; Gordon, 1987).

Todo processo de homeostase de uma colônia que envolve novas organizações e mudanças de comportamentos, individuais ou sociais, depende de um sofisticado mecanismo de comunicação química. As intercomunicações ocorrem através de emanações de substâncias químicas (feromônios) exaladas de diferentes partes do corpo das formigas e percebíveis por suas irmãs, através das antenas que são órgãos de percepção química. Esses avisos químicos têm, de acordo com as substâncias desprendidas e circunstâncias do momento, funções diferentes como: alarme de invasão, chamados para os cuidados com a prole, recrutamento para a busca de alimentos e muitas outras ainda não bem conhecidas (Hölldobler e Wilson, 1990). Além de se comunicar através de feromônios as formigas são capazes de perceber diversas variações ambientais entre elas as de temperatura e umidade. Uma vez identificadas essas variações as operárias podem modificar o seu comportamento. Desta maneira, a colônia, aparentemente, reconhece a existência de um problema e passa a se comportar de forma a tentar corrigi-lo. (Roces e Kleineidam, 2000).

Nesta aula nos basearemos na descrição e discussão de experimentos realizados em nosso laboratório. Estes experimentos mostram a plasticidade comportamental que formigas *Atta sexdens rubropilosa* podem apresentar em diversas situações.

Referências

- Adam, G.H. & Ratnieks, F.L.W. (2001). Task partitioning, division of labour and nest compartmentalization collectively isolate hazardous waste in the leafcutting ant *Atta cephalotes*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **49**: 387-392.
- Andrade, A.P.P.; Forti, L.C.; Moreira, A.A.; Boareto, M.A.C.; Ramos, V.M. & Matos, C.A.O. (2002). *Sociobiology* vol. 40, nº 2, 2002.

- Autuori, M. (1941). **Contribuição para o conhecimento da saúva**. (*Atta* ssp –Hymenoptera Formicidae) I- Evolução do sauveiro *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908.
- Autuori, M. (1942). **Contribuição para o conhecimento da saúva** (*Atta* ssp. Hymenoptera). (Formicidae) III- Excavação de um sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa*. Forel, 1908). *Arq. Inst. Biol.* 13: 137-148.
- Autuori, M. (1947). **Contribuição para o conhecimento da saúva** (*Atta* ssp. – Hymenoptera Formicidae) IV- O sauveiro depois da 1º revoada (*Atta sexdens rubropilosa*,Forel.1988). *Arq. Inst. Biol.* 18: 39-70.
- Bergmeier, T. e al. 1948. **Combate à saúva. Biologia- Formicidas- Extintores- Cuiabanas** Ed. *Chac. e Quint. S. Paulo*, nº 42, 35.
- Bonabeau, E.; Theraulaz, G.; Deneubourg, J.L.; Aron, S. & Camazine S., 1997. Self- organization in social insects. *Trends in Ecology and Evolution*. **12 (5)**: 188-193.
- Carvalho, A.M.A. (1972). Alguns dados sobre a divisão do trabalho entre operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908 em colônias iniciais mantidas em laboratório. Tese de doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Carvalho, J. H. (1935). Ligeiras notas sobre o combate à saúva. *Min. Agric., Dept. Nac. da Prod. Vegetal Serv. Defesa Sanitária Vegetal*. Publicação nº 3 18 pp.
- Cherret, J.M. (1968). The foraging behaviour of *Atta Cephalotes* (L.). (Hymenoptera: Formicidae). I. Foraging pattern and plant species attacked in tropical rain forest. *Journal of Animal Ecology*, **37**: 387-402.
- Detrain, C & Pasteels, J.M. (1992). Caste polyethism and collective defense in the ant, *Pheidole pallidula*: the outcome of quantitative differences in recruitment. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **29**:405-412.
- Gordon, D.M. (1999). *Ants at work: How an Insect Society is Organized*. The Free Press, Simon and Schuster, de Nova York, USA.
- Haines, B. L. (1978). Element and energy flows through colonies of the leaf-cutting ant, *Atta colombica* in Panama. *Biotropica*, 10 (4): 270-277.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. (1990). *The Ants*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts 732 pp.
- Hölldobler, B. and F.O. Wilson 1994. *Journey to the ants*. Library of Congress Cataloging- in- Publication data. USA. 228 pp.
- Kerr, W. (1961). Acasalamento de rainhas com vários machos em duas espécies da tribo Attini (Hymenoptera, Formicoidea). *Rev. Brasil. Biol.* **21(1)**: 45-48
- Mariconi, F.A.M. (1970). **As saúvas**. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, Brasil. 167 pp.
- Mariconi, F.A.M.; Berti Filho, E. & Fontes, L.R. (1996). **Anais do Simpósio sobre Formigas Cortadeiras dos Países do Mercosul**. Fundação de Estudos Agrários Luis de Queiroz- Piracicaba, São Paulo, Brasil. 139 pp.
- Mueller, U.G. & Wcislo, W.T. (1998). Nesting biology of the fungus-growing ant *Cyphomyrmex longiscapus* Weber (Attini, formicidae).
- Oliveira Filho, M.L. (1934). Combate à saúva. *Bol. Agric.* **35**: 541-610.
- Ribeiro, P.L. & Navas, C.A. (2004). A study on the influence of relative humidity in the selection of a garbage disposal location in *Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908 (Hymenoptera- Formicidae) (submetido).
- Roces, F. & Nuñez, J. (1995). Thermal Sensitivity During Brood Care in Workers of Two Camponotus Ant Species: Circadian Variation and Its Ecological Correlates. *J. Insect. Physiol.* **41(8)**: 659-669.
- Roces, F. & Hölldobler, B. (1994). Leaf density and a trade-off between load-size selection and recruitment behavior in the ant *Atta cephalotes*. *Oecologia* **97**: 1-8.
- Roces, F & Kleineidam, C. (2000). Humidity preference for fungus culturing by workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* . *Insectes soc.* **47**: 348-350.
- Stahel, G. & Geijskes, D.C. (1940). Observations about temperature moisture in *Atta*- nests. *Rev. Entomol.* 11: 766-775.
- Wilson, E.O.(1971). **The Insects Societies** The Belknap of Harvard University Press.
- Wilson, E.O. (1980a). Caste and Division of Labour in Leaf-cutter Ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*) *Behavioural Ecology and Sociobiology*. **7**: 143-156.

RELÓGIO BIOLÓGICO DE MAMÍFEROS: MECANISMOS MOLECULARES E CONTROLE DA RITMICIDADE INTERNA DO ORGANISMO.

Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes

Laboratório de Cronofarmacologia

Aspectos Abordados:

O intuito desta aula será passar um pouco da evolução dos relógios biológicos ao longo das espécies até chegarmos aos mamíferos onde o estudo será aprofundado. Discutiremos os mecanismos moleculares que controlam a ritmicidade interna do relógio central e como ele é sincronizado por fatores externos como, por exemplo, o ciclo claro/escuro ambiental.

O relógio biológico central transmite as informações rítmicas ambientais para diversos osciladores internos que, por sua vez, promovem respostas fisiológicas que se refletem em padrões comportamentais específicos. Para ilustrar este processo tomarei por base o controle do relógio sobre a produção rítmica dos glicocorticóides e da melatonina. Aproveitando para fazer um gancho com a minha área de pesquisa que consiste na investigação da inter-relação entre as glândulas pineal e adrenal durante um processo inflamatório crônico.

Introdução:

Os seres vivos, na sua forma mais simples, como os seres unicelulares, até sua forma mais complexa, como os vertebrados, são estruturados no tempo e no espaço. A maioria dos parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais dos organismos apresenta flutuações diárias que persistem sob condições constantes, indicando que osciladores endógenos foram incorporados aos sistemas em resposta às variações do ciclo claro-escuro ambiental (Menaker et al., 1997).

No centro dos sistemas que controlam e regulam os ritmos circadianos dos vertebrados estão três estruturas que se interconectam num "eixo circadiano central", que são: os núcleos supraquiasmáticos (NSQ), a retina e as glândulas pineal e adrenal (Menaker et al., 1997). Estes otimizam as atividades básicas diárias, a vida reprodutiva e algumas respostas sazonais.

O sistema mínimo requerido para adaptação às variações ambientais seria um relógio endógeno, independente do meio ambiente, um sistema sensor que pudesse detectar as alterações rítmicas do meio ambiente e um ou mais elementos sincronizadores, que teriam como função o ajuste do meio interno e das funções vitais às variações ambientais. Recentemente, foram descritos os mecanismos moleculares do relógio central (NSQ) e de relógios biológicos locais, chamados de servo relógios (Reppert e Weaver, 2002). Também é conhecida a forma como a retina é capaz de detectar luz e enviar a informação fóptica para os NSQ (Provencio et al., 2000) e o papel de diversos marcadores internos como, por exemplo, o da melatonina – hormônio produzido e liberado pela glândula pineal- como marcador do escuro e o dos glicocorticóides -produzidos ritmicamente pela

glândula adrenal- como antecipadores do período de atividade, agindo portanto sobre o ciclo vigília/sono dos indivíduos.

Bibliografia:

Cronobiologia:Princípios e Aplicações (2003) - Organizadores: Nelson Marques e Luiz Menna-Barreto; editora Fiocruz.

Menaker, M.; Moreira, L.F. & Tosini, G. (1997). Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **30**: 305-313, 1997.

Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**: 935-941.

Provencio, I; Rodriguez, I.R.; Jiang, G.; Hayes, W.P.; Moreira, E.F. & Rollag, M.D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* **20**: 600-605.

Lang, V. & Sizonenko, PC. (1988) Melatonin and human adreno-cortical function. In: Miles, A., Philbrick, D.R.S. Thompson, C (eds) **Melatonin, clinical perspectives**. Oxford University Press, pp 62-78.

Sites Recomendados:

www.nature.com

www.pubmed.com

SISTEMA DIGESTÓRIO

Carlos Eduardo Cruz

Laboratório de Fisiologia Molecular do Trato Digestivo

ASPECTOS EVOLUTIVOS - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Protozoários e alguns organismos multicelulares (como esponjas) não apresentam um trato digestivo, e a digestão ocorre intracelularmente. Embora isto possa parecer uma característica primitiva, já foi verificado em *Paramecium* que a digestão intravacuolar está associada à uma acidificação e alcalinização sequencial, de uma maneira similar ao que ocorre no sistema digestivo de vertebrados.

O movimento do alimento e fluidos ao longo do canal alimentar é realizado por células ciliares no sistema digestivo de muitos invertebrados. O transporte de secreções digestivas também pode ser ajudado através do movimento ciliar nos cecos e dutos glandulares. À medida que o tamanho das partículas de alimento e o diâmetro do trato digestivo aumentaram, os cílios perderam a sua eficiência, estando ausentes em alguns grupos como nematóides e insetos, favorecendo a participação de movimentos musculares no transporte do alimento.

Na maior parte dos invertebrados, há a formação de regiões mais especializadas como cecos e regiões glandulares responsáveis pela secreção, excreção e absorção de nutrientes. Moluscos e artrópodos apresentam glândulas salivares altamente desenvolvidas. Em anelídeos o arranjo geral dos órgãos e tecidos é similar ao observado em vertebrados. Em moluscos, já ocorre a formação de estruturas hepáticas apresentando diferentes tipos celulares, e que são responsáveis pela absorção, digestão intracelular, secreção, excreção e armazenamento, e produzem algumas enzimas digestivas que são secretadas para a região estomacal.

A digestão, fermentação microbiana e a síntese de nutrientes são complementadas pela presença de endossimbiontes em muitas espécies de vertebrados, estando bem documentada em anelídeos, moluscos, equinodermos e insetos. Buchner (1965) verificou que a presença de algas nas células que revestem o trato digestivo de muitos invertebrados serve para garantir ao hospedeiro O_2 , carboidratos, uma região de armazenamento de alimento, além servir de mecanismo de excreção de CO_2 , PO_4 e compostos nitrogenados.

O SISTEMA DIGESTIVO SEGUE CINÉTICAS ENZIMÁTICAS DE REATORES QUÍMICOS

De uma perspectiva fisiológica, sistemas alimentares podem ser agrupados em três categorias com base em como eles processam o alimento em um reator químico, ou local de digestão química. O trato digestivo dos celenterados, por exemplo, funciona como um reator em batelada (tipo "batch"), pois não recebe alimento continuamente, ou seja, é necessário que parte do alimento seja processado e eliminado antes da entrada de mais alimento. No estômago de ruminantes, por outro lado, ocorre a digestão autocatalítica, através da presença de microorganismos simbiotes, e este funciona como um

reator contínuo de mistura em estado estacionário (do tipo CFSTR), pois **i.** recebe entrada contínua de substratos, **ii.** o seu conteúdo é retirado continuamente e **iii.** a corrente de saída possui as mesmas características do conteúdo do tanque do reator, sem variação ao longo do tempo. O intestino delgado de mamíferos funciona como um reator tubular em estado estacionário (do tipo “plug flow”), aonde a concentração dos reagentes e a velocidade de consumo destes reagentes variam ao longo de seu comprimento, considerando que nesta região ocorre a absorção de nutrientes. Este tipo de reação química ocorre durante a digestão catalítica, aonde enzimas digestivas endógenas atuam na hidrólise do alimento.

CLASSIFICAÇÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS

As enzimas digestivas foram amplamente conservadas ao longo da cadeia evolutiva. Independentemente do organismo em questão, estas podem ser divididas, de uma maneira simplificada, em proteases, carboidrases e lipases.

As proteases, que atuam sobre cadeias peptídicas de diferentes tamanhos, são divididas em endopeptidases, quando hidrolisam os peptídeos internamente, ou exopeptidases, quando a hidrólise é feita pela cadeia amino- ou carboxi- terminal. Tais enzimas também são classificadas de acordo com os aminoácidos que participam do processo catalítico no sítio ativo, podendo ser subdivididas em cisteína-, serina-, aspartato- e metaloproteinases.

Tripsinas, quimotripsinas, elastases, pepsinas, quimosinas e collagenases, por exemplo, são endopeptidases que catalisam a hidrólise de diferentes aminoácidos, que podem ser básicos, como arginina e lisina (no caso das tripsinas), ou catalisar a hidrólise do grupo carboxila de aminoácidos aromáticos, como fenilalanina e triptofano (no caso das quimotripsinas). Dentre as exopeptidases, podemos destacar as aminopeptidases, carboxipeptidases A e B e dipeptidases. As aminopeptidases hidrolisam aminoácidos a partir do grupo amina das cadeias peptídicas e são classificadas com base na sua dependência por íons metálicos (geralmente Zn^{+2} ou Mn^{+2}) e especificidade ao substrato. As carboxipeptidases hidrolisam aminoácidos a partir do grupamento carboxila da cadeia peptídica, e podem ser classificadas, de acordo com o seu mecanismo catalítico, em serina, metalo- e cisteína carboxipeptidases.

As proteínas são sequencialmente hidrolisadas por endopeptidases extracelulares que atacam ligações peptídicas ao longo da cadeia protéica, e exopeptidases, que hidrolisam aminoácidos terminais. Oligo- e dipeptídeos são posteriormente hidrolisados por enzimas presentes em microvilosidades com borda em escova (ligadas diretamente à membrana ou associadas ao glicocálix) ou presentes no conteúdo das células intestinais absorptivas.

A maioria das endopeptidases é secretada como zimógenos inativos, e são ativadas no lúmen do trato digestivo, protegendo assim os tecidos do hospedeiro contra ataque proteolítico.

Os polissacarídeos são inicialmente clivados por alfa-amilases na maioria dos organismos estudados. Amilose, amilopectina e glicogênio são hidrolisados por alfa-amilases para formar maltose, isomaltose, maltotriose e outros oligossacarídeos de ligação alfa-1,4. Maltase posteriormente atua nas

maltoses, mas é incapaz de hidrolisar as ligações alfa-1,6 de isomaltose, o que é realizado pela isomaltase ligada às células epiteliais intestinais. Alfa-amilase, maltase e sacarase são classificadas como alfa-glicosidases, pois catalisam a hidrólise da ligação glicosídica alfa-1,4 de oligossacarídeos e di-holosídeos. As beta-glicosidases hidrolisam ligações covalentes beta-1,4 entre holosídeos, como celulose, hemicelulose e celobiose.

Embora enzimas endógenas de vertebrados consigam hidrolisar as ligações alfa-1,4 e alfa-1,6 em amido e glicogênio, elas não são capazes de hidrolisar as ligações beta-1,4 encontradas em celulosas e hemicelulosas, ou as ligações alfa-1,4 de pectinas e galactanos, sendo esta digestão realizada através da atividade microbiana. Quitina pode ser digerida por vários grupos de vertebrados, incluindo mamíferos, aves e répteis, além de ser digerida por microorganismos.

Todos os dissacarídeos, com exceção da quitobiose, são hidrolisados a monômeros por dipeptidases presentes nas membranas das microvilosidades intestinais.

As esterases, diferentemente de lipases, geralmente hidrolisam lipídeos que estão em solução. As lipases descritas na maioria dos vertebrados hidrolisam triglicerídeos na ligação éster C-1 e C-3, liberando dois ácidos graxos e um beta-monoglicerídeo. Esterases hidrolisam monoésteres tais como lecitina e colesterol, liberando lisolecitina, colesterol e os seus respectivos ácidos graxos.

Os lipídeos clivam ácidos graxos de cadeia longa mais rapidamente do que esterases, cuja especificidade parece ser mais dependente do tipo de álcool do que da estrutura do ácido graxo. As lipases já foram encontradas em secreções salivares, faríngeas e gástricas em diversos grupos animais, mas são secretadas principalmente pelo pâncreas na maioria dos vertebrados e parecem ser as enzimas mais importantes para a digestão lipídica. As esterases também são predominantemente enzimas pancreáticas em vertebrados.

Sais biliares e fosfolipídeos (principalmente lecitina) contribuem para a emulsificação e absorção das gorduras da dieta, e também servem como via principal de excreção de colesterol e produtos finais do catabolismo da hemoglobina. Todos os sais biliares parecem ser derivados de colesterol. Em peixes e anfíbios, eles consistem primariamente de álcoois sulfatados, e conjugados de taurina e glicina em vertebrados acima destes grupos evolutivos. Uma vez iniciado o processo de emulsificação, a lisolecitina, produto da hidrólise de lecitina, e os produtos finais da hidrólise de triglicérides, também agem como detergentes fortes.

BIBLIOGRAFIA BÁSICA

Withers, P.C. **Comparative Animal Physiology**, Saunders College Publishing, 1992

Randall, D.J. **Animal Physiology – Mechanisms and Adaptations**, Freeman and Company, 1997

Schmidt-Nielsen, **Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente**, Editora Santos, 1996

MECANISMOS DE OSMORREGULAÇÃO EM ANIMAIS.

James Fernando Malta da Silva

Luis Alberto Valotta

Prof. Dr. Luiz C. Salomão

Laboratório de Osmorregulação

COMENTÁRIOS GERAIS

adaptado de R. Gilles (1979) por

Luis Alberto Valotta

James Fernando Malta da Silva

A vida na Terra é dependente de água. Os seres vivos são sistemas bioquímicos altamente sofisticados organizados em torno das propriedades desta molécula. A água constitui-se no principal meio onde as interações moleculares indispensáveis à vida ocorrem. Também se constitui no veículo que transporta as moléculas para diferentes locais onde essas interações podem ocorrer.

Além dos muitos compostos orgânicos encontrados como solutos nos seres vivos, os íons inorgânicos também são de fundamental importância: participam como cofatores em muitas reações enzimáticas; formam os gradientes químicos os quais podem atuar como estoques de energia potencial; e influenciam na permeabilidade das membranas biológicas a outros solutos. Os diversos solutos encontrados nas células vão, por outro lado, influenciar a mobilidade osmótica da água e, portanto, irão desempenhar um papel proeminente na manutenção da arquitetura celular. Além disso, muitos dos sistemas enzimáticos que controlam as interações químicas características da vida estão localizadas em estruturas altamente organizadas. Isto aponta a importância da manutenção da estrutura celular e volume nas reações as quais envolvem estas enzimas como catalisadores.

Basicamente, as células podem ser vistas como máquinas químicas extremamente complexas nas quais a localização e a concentração de várias espécies moleculares interagentes devem ser precisamente controladas no sentido de manter atividade ótima. Em tal contexto, o controle e a manutenção do volume celular podem ser considerados requisitos essenciais à vida. Além disso, o problema da regulação de volume celular é um dos elementos cruciais na conquista de diferentes biótopos e no estabelecimento de organismos em ambientes aquáticos com flutuações de salinidade. De acordo, a vida foi originada em algum tipo de oceano e a capacidade de controlar o volume celular é um dos principais pré-requisitos para a invasão de outros tipos de habitats como os ambientes de água doce e terrestre. Os organismos que habitam este meio desenvolveram adaptações osmóticas específicas habilitando a sua manutenção em suas comunidades. Há várias maneiras através das quais o problema da manutenção do volume celular pode ser resolvido. O organismo pode isolar-se completamente do meio externo, evitando dessa forma o ganho ou a perda de água. Esta solução não foi mantida por um grande número de espécies ao longo da evolução. Trocas com o meio externo são

necessárias para satisfazer as necessidades celulares. Alguns esporos bacterianos podem sobreviver por longos períodos com um conteúdo baixo de água e sem trocas com o seu meio ambiente; nesta situação, entretanto, seus processos vitais são essencialmente suspensos. Na maioria dos organismos, a água atravessa a membrana celular por difusão em resposta a gradientes osmóticos. Há duas maneiras de evitar mudanças no volume celular enquanto mantém-se a possibilidade de trocas entre o fluido intracelular e o meio ambiente. O primeiro método consiste no controle da Concentração Osmótica (CO) do fluido intracelular em relação a eventuais modificações do meio externo. O segundo método implica no controle da CO do fluido que circunda as células em quaisquer condições externas. A última solução foi adotada por diversos eucariotos e foi denominada por Florkin (1962), de a "regulação anisomótica extracelular". Embora a existência de um fluido extracelular diferente do meio externo foi observada precocemente na evolução, a efetiva regulação deste meio (os fluidos corpóreos) é um atributo de apenas alguns grupos zoológicos altamente evoluídos. Pode ser encontrado em alguns vermes e moluscos, mas, essencialmente, ocorre em artrópodes e em vertebrados. Além disso, muitos dessas espécies são incapazes de manter o estado osmótico de seu sangue quando a CO do ambiente varia.

Os mais eficientes reguladores anisomóticos formam a categoria denominada dos assim chamados animais homeostáticos; essas espécies podem manter a CO do seu sangue estacionária independente das condições externas. Além de alguns crustáceos e peixes, representantes deste grupo são encontrados entre répteis, aves, e mamíferos. Os íons inorgânicos Na^+ e Cl^- são predominantes como efector osmótico sanguíneo na maioria dos reguladores anisomóticos. Uréia é usada por alguns vertebrados inferiores. Este composto orgânico é encontrado essencialmente em ciclostomados e em elasmobrânquios, mas também tem um papel em vários anfíbios e répteis.

O controle da CO do "meio interno" em reguladores anisomóticos é alcançada por diferentes mecanismos, sempre envolvendo o transporte de sais, e localizada em vários órgãos. Os órgãos "transportadores de sal" podem ser morfologicamente muito diferentes variando, por exemplo, de um rim de mamífero à brânquia de um crustáceo ou a papila anal de algumas larvas de inseto. É fundamental considerar que, com a exceção da glândula nasal de sal encontrada em aves e répteis, as quais parecem ser ligeiramente diferentes devido aos seus métodos de controle, os "órgãos transportadores de sal" são construídos basicamente em modelos fisiológicos muito similares: todos realizam transporte ativo de sódio o qual é uma das forças motrizes para o movimento de água, o contratransporte implicado no processo de saída de Na^+ é sempre NH_4^+ , H^+ ou K^+ e a ultraestrutura desses órgãos é bem semelhante. Além disso, apresentam importantes dobramentos das membranas celulares, grandes espaços intercelulares e elevada densidade de mitocôndrias essencialmente localizadas próxima às membranas de trocas. É possível que esses mecanismos derivem a partir de um mecanismo básico de transporte de Na^+ o qual controla o outro e mais primitivo processo de manutenção do volume celular; que é, o controle da CO do fluido intracelular.

Como mencionado anteriormente, há apenas alguns animais homeostáticos. Em todos as outras espécies, as células têm que, algumas vezes, se defrontar com importantes mudanças na CO de seu meio ambiente. Além disso, os eficientes mecanismos de controle da CO sanguínea que atuam

em espécies homeostáticas podem estar encobertos sob certas condições ou podem apresentar uma certa demora em responder a uma nova situação. Isto aponta para a importância dos mecanismos de controle osmótico do fluido intracelular na manutenção do volume celular.

O processo responsável para o balanço da CO pode manter o gradiente osmótico entre os fluidos intracelular e extracelular ou atuar no sentido de manter esses dois meios próximos a condições isosmóticas. A primeira solução é encontrada em células vegetais, em esponjas de água doce e em protozoários. Células vegetais são envolvidas por paredes celulares rígidas para evitar o inchamento resultante do influxo osmótico de água. O problema do influxo de água em esponjas de água doce e em protozoários é resolvido pela existência de vacúolos contráteis, cuja função primária é remover qualquer excesso de água. Na maioria das espécies de animais eucarióticas, os fluidos intra e extracelulares são mantidos próximos da condição isosmótica. Os mecanismos implicados neste processo foram denominados por Florkin (1962) como mecanismos de "regulação isosmótica intracelular". Trabalham para manter o equilíbrio osmótico apesar da presença de solutos aniônicos não-difusíveis no interior das células; estas partículas geram uma pressão osmótica a qual, de outra forma, iria induzir o inchamento e a lise das células de animais por possuírem membranas facilmente distensíveis. Além disso, estes mecanismos são de fundamental importância na resposta regulatória de volume que estas células são capazes de desenvolver após mudanças na CO de seu meio ambiente. Em todos os tecidos e células estudados até o momento, eles implicam no controle ativo do montante de vários efetores osmóticos intracelulares entre os quais os íons inorgânicos Na^+ , K^+ e Cl^- e os aminoácidos livres possuem um papel proeminente.

Os mecanismos de regulação isosmótica intracelular foram encontrados em tecidos e células de muitas espécies de vários grupos zoológicos incluindo protozoários, invertebrados, e vertebrados. É importante notar que muitos desses organismos ou não possuem, ou possuem de forma muito frágil, a capacidade de regulação anisomótica extracelular. Pode-se, portanto, concluir que a regulação isosmótica em nível celular um processo mais primitivo o qual apareceu precocemente e persistiu ao longo da evolução. Processos de regulação anisomóticos devem ter sido adquiridos posteriormente, adicionando às espécies que o possuíam um novo leque de possibilidades.

Bibliografia Geral.

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J.D. *Molecular Biology of The Cell* (3rd edition). Garland Publishing Inc. (1994).
- BURGGREN, W. W., FRENCH, K., RANDALL, D. J. *Eckert Physiology: Mechanisms and Adaptations* (5th edition). W H Freeman & Co. 2002.
- FLORKIN, M. La regulation isosmotique intracellulaire chez les invertebrés marins euryhalins. *Bull. Acad. R. Belg. Cl. Sci.*, **48**, 687-694, 1962.
- GILLES, R. (Editor) *Mechanisms of osmoregulation in animals: maintenance of cell volume* (1st edition) John Wiley & Sons. 1979.
- GUPTA, B. L., MORETON, R. B., OSCHMAN, J. L. & WALL, B. J. *Transport of ions and water in animals* (1st edition). Academic Press. 1977.
- HILL, R. & WYSE, G. *Animal Physiology* (2nd edition) Addison-Wesley Pub Co. 1989.
- PROSSER, C. L. (Editor) *Comparative Animal Physiology, Environmental and Metabolic Animal Physiology* (4th edition) John Wiley & Sons. 1991.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. *Animal Physiology : Adaptation and Environment* (1st edition) Cambridge University Press. 1997.

- STONE, G., JOHNSTON, I. A. & WILLMER, P. J. Environmental Physiology of Animals (2nd edition). Blackwell Science Inc. 2000
- STRANGE, K. (Editor) Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation (1st edition). CRC Press. 1994.
- WITHERS, P. C. Comparative Animal Physiology (1st edition). Harcourt Brace. 1992.

Periódicos Indexados.

- Advances in Comparative Physiology and Biochemistry.
- American Journal of Physiology.
- Annual Review of Physiology.
- Cellular Physiology and Biochemistry.
- Comparative Biochemistry and Physiology.
- Environmental Physiology and Biochemistry.
- Experimental Physiology.
- General Physiology and Biophysics.
- International Review of Physiology.
- Journal of Cellular and Comparative Physiology.
- Journal of Cellular Physiology.
- Journal of Comparative Physiology.
- Journal of Experimental Biology.
- Journal of Experimental Zoology.
- Journal of General Physiology

EXERCÍCIO TEÓRICO-PRÁTICO

Balanco Osmótico em Ambientes Marinho, de Água Doce e Xérico.

elaborado por

Prof. Dr. Luiz Carlos Salomão

Introdução

Nos animais aquáticos, especialmente nos animais marinhos e estuarinos, as variações da salinidade do meio podem resultar em variações nas concentrações iônica e osmótica do sangue e fluidos extracelulares. Animais marinhos hiposmóticos estão sujeitos ao efluxo de água e influxo de íons, contrariamente aos animais de água doce, que por serem hiperosmóticos, estão sujeitos ao influxo de água e efluxo de íons, alterando a Concentração Osmótica (CO) do sangue e líquidos tissulares.

Há dois padrões básicos de resposta dos animais a tais variações na salinidade, isto é, osmoconformação e osmorregulação. No primeiro caso, a CO do sangue, hemolinfa ou líquidos extracelulares varia linearmente com a variação da CO do meio. No segundo caso, a CO se mantém constante apesar das variações na salinidade do meio. Entre estes dois casos extremos, osmorregulação e osmoconformação, ocorrem respostas intermediárias. Para se saber o padrão de resposta osmótica, em laboratório, geralmente submetem-se os animais a meios de diferentes salinidades, ou seja, de composições iônicas diferentes e determinam-se as concentrações iônicas e a CO do sangue destes animais nestas diferentes condições experimentais.

Já no ambiente terrestre, em que a grande vantagem é a maior disponibilidade de oxigênio, o balanço hídrico é de outra natureza e, muitas vezes, é obtido tanto por ajustes fisiológicos como comportamentais. Tal é que se observa, por exemplo, no banco hidromineral do rato canguru *Dipodomys merriami*. Entre os mamíferos, 40% das espécies pertence a Ordem dos roedores, a mais numerosa. Distribue-se por todo planeta, mas principalmente na América do Sul. Adaptaram-se aos diferentes ambientes, das regiões polares ao equador, das montanhas as praias e do deserto aos pântanos. A maioria dos roedores é terrestre, mas alguns são arborícolas ou semi-aquáticos. A maior parte dos roedores é de pequeno porte, isto é, de 10 a 20 cm de comprimento e de 50 a 500 g de massa corporal. Alguns, no entanto, como uma espécie de porco espinho (*Hystrix cristata*) do norte da África chega a atingir massas corpóreas de 20-50 kg. A presença dos roedores tem relevante papel ecológico por serem a principal fonte de alimento para aves e mamíferos carnívoros, havendo uma relação bem estabelecida entre o tamanho da população de roedores e suas presas. A relação com os homens não se limita à destruição da agricultura ou à transmissão de doenças. São úteis como animais de laboratório, por consumirem certos insetos e por propiciarem o arejamento do solo cavando galerias subterrâneas.

Entre os mamíferos, são os roedores que ocuparam os mais diferentes ambientes com relação à disponibilidade à água. Estão presentes nos desertos mais áridos onde a água não está disponível, mas que também se tornou dispensável para eles. Nesse sentido, deve-se ressaltar as pesquisas de

Schmidt-Nielsen (1964) sobre os hábitos e a fisiologia renal do rato canguru que vive numa região tão inóspita, quanto à disponibilidade de água, que poucas outras espécies lhe fazem companhia.

Respostas osmóticas em *Perna perna*

A Tab. 1 apresenta resultados em experimentos realizados com o molusco bivalve *Perna perna*. Os mexilhões *Perna perna* foram coletados em costões nas proximidades de São Sebastião e foram transferidos para tanques de cimento amianto e mantidos em água de mesma salinidade do local de coleta, isto é, 1000 mOsm/kg H₂O por cerca de 24 h. A seguir foram distribuídos em tanques de cimento amianto contendo água do mar diluída com água destilada, obtendo-se, assim, as diferentes salinidades experimentais. Em cada salinidade experimental foram colocados mexilhões com cunha entre as valvas e sem cunha. A hemolinfa dos animais com cunha foi coletada após 6 h de exposição aos diferentes meios, tempo previamente determinado considerando ser este período o suficiente para as trocas osmo-iônicas. Nos animais sem cunha, as amostras foram obtidas após 24 h. O objetivo das cunhas era o de manter a livre exposição das partes moles do animal aos meios experimentais. Manteve-se arejamento contínuo durante todo o experimento.

Tabela 1. Concentração osmótica da hemolinfa de *Perna perna*, com cunha e sem cunha mantidos em diferentes salinidades. Valores em mOsm/kg H₂O. As concentrações osmóticas foram determinadas pelo abaixamento do ponto de congelamento conforme descrito por Salomão (*Bolm Fisiol. Animal, Univ. S. Paulo, 4: 143-152, 1980*).

Meio	250	410	560	700	850	1000	1150	1300
c/ cunha	†	417	598	685	864	1016	1150	1320
s/ cunha	910	650	620	730	860	1020	1160	1315

Estes resultados podem ser visualizados na figura abaixo:

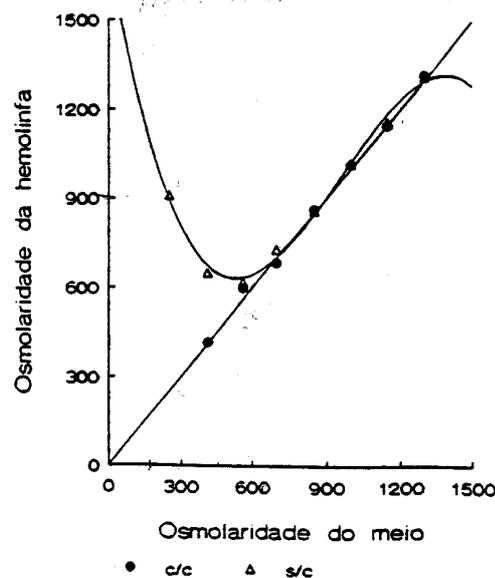


Fig.1. Variação da concentração osmótica da hemolinfa de *Perna perna* mantidos em diferentes concentrações osmóticas (salinidades). Os círculos correspondem aos valores obtidos em animais com cunha entre as valvas e os triângulos em animais sem cunha. A regressão linear, para o caso dos animais com cunha é dada por: $y = 0,99x + 12$. No caso dos animais sem cunha a curva pode ser ajustada por um polinômio de terceiro grau: $y = 2,1 \cdot 10^{-8} x^3 + 0,006 x^2 - 4,7 x + 1733$

Respostas osmóticas em *Macrobrachium olfersii*

Exemplares de *Macrobrachium olfersii* foram coletados no Rio Guaecá, cuja salinidade é próxima de zero, transportados para o laboratório em condições que garantiam a sua higidez, onde foram mantidos em tanques de cimento amianto, com água do mesmo local de coleta, continuamente arejada. Após um período de permanência em meios iguais aos dos locais de coleta, os animais foram transferidos para tanques com água do mar diluída a fim de se obter as diferentes salinidades desejadas (concentrações osmóticas). A Tab. 2 indica os valores da concentração osmótica dos oito diferentes meios experimentais e da hemolinfa dos camarões *Macrobrachium* sp. E a figura 2 mostra estes dados plotados e ajustados por uma função polinomial de 3º grau.

Tabela 2. Concentração osmótica (mOsm/kg H₂O) da hemolinfa de *M. olfersii* e dos diferentes meios em que foram mantidos. As concentrações osmóticas foram determinadas pelo abaixamento do ponto de congelamento em um osmômetro Fiske.

Meio	0	150	300	450	600	750	900	1000
Hemolinfa	430	480	500	510	550	580	650	800

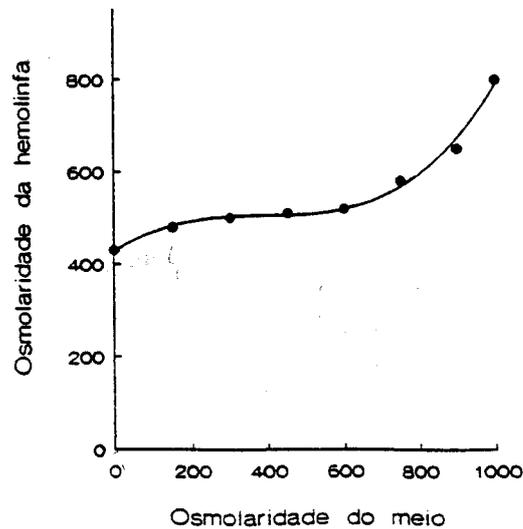


Fig.2. Variação da concentração osmótica em *Macrobrachium olfersii* mantidos em diferentes salinidades (concentrações osmóticas). O ajuste da curva corresponde a função polinomial de 3º grau dada pela expressão:
 $y = 1,2 \cdot 10^{-6} x^3 - 0,01 x^2 + 0,56 x + 427$

Discussão

1. Como você definiria o comportamento osmótico de *M. olfersii* e de *P. perna*?
2. No caso de *P. perna*, em que sentido a introdução da cunha altera a resposta osmótica? Qual o significado fisiológico desta alteração?
3. Que tecidos ou órgãos seriam mais sensíveis ao estresse osmótico? Por que?
4. Em que níveis compartimentais estes fenômenos podem ser abordados?
5. O que se pode dizer acerca da eurihalinidade destes dois animais, a partir dos resultados obtidos?

6. A resposta osmótica de *P. perna* à variação de salinidade pode ser expressa por uma função do tipo $y = ax + b$, enquanto que a do *M. olfersii* seria por uma função do tipo $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$. Qual o significado fisiológico destas representações?
7. No caso de *P. perna* com cunha e sem cunha, o que seria uma abordagem reducionista e uma abordagem holística, sistêmica ou integrativa?

Osmorregulação no rato canguru

O balanço hidromineral no rato canguru se torna crítico em razão do ambiente inóspito em que vive fazendo-o depender apenas da pouca água contida nos alimentos e da água metabólica.

A Tab. 3 resume o balanço hídrico do rato canguru.

Ganho		Perdas	
Água metabólica	90%	Evaporação	16%
Água livre nos alim.	10%	Respiração	54%
Bebida	0%	Urina	25%
		fezes	5%

A perda de água através da pele, por evaporação, é reduzida mas chega a 16% enquanto que mais da metade da perda total ocorre através do trato respiratório. As glândulas sudoríparas estão ausentes da superfície do corpo dos roedores, sendo encontradas apenas em determinadas áreas, como nas partes sem pêlo das patas. O estudo da perda de água através da respiração levou Schimidt-Nielsen a descrever um fenômeno interessante que ocorre em outros animais.

A Tab. 4 mostra as diferentes formas de indicar a quantidade de água, na forma de vapor, presente no ar em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Vapor de água			
	mmHg	kPa	% de 1 atm	mg H ₂ O/L ar
0	4,6	0,61	0,6	4,8
10	9,2	1,23	1,2	9,4
20	17,5	2,34	2,3	17,3
30	31,7	4,24	4,2	30,3
40	55,1	7,38	7,3	51,1
50	92,3	12,33	12,2	83,2
100	760	101,33	100	598
37	46,9	6,28	6,2	43,9

Como se vê nesta Tabela o ar saturado na temperatura do corpo (37 °C) contém cerca de 2,5 vezes mais água na forma de vapor do que o ar saturado na temperatura ambiente (20 °C), isto é,

43,9 e 17,3 mg/L, respectivamente. Assim, se o ar exalado for resfriado a perda de água por esta via seria menor. De fato a temperatura do epitélio nasal é mais baixa do que de outras regiões do corpo e, portanto, há economia de água. Este mecanismo, encontrado em outros mamíferos e em aves, é denominado de *mecanismo de contra-corrente nasal*. No homem a temperatura do ar exalado está próxima daquela do corpo. Logo, não há economia de água.

A Fig. 3 mostra a quantidade de água recuperada de água em duas condições: a 15 °C e 25 % de umidade relativa do ar (u.r.) e a 30 °C e 25 %

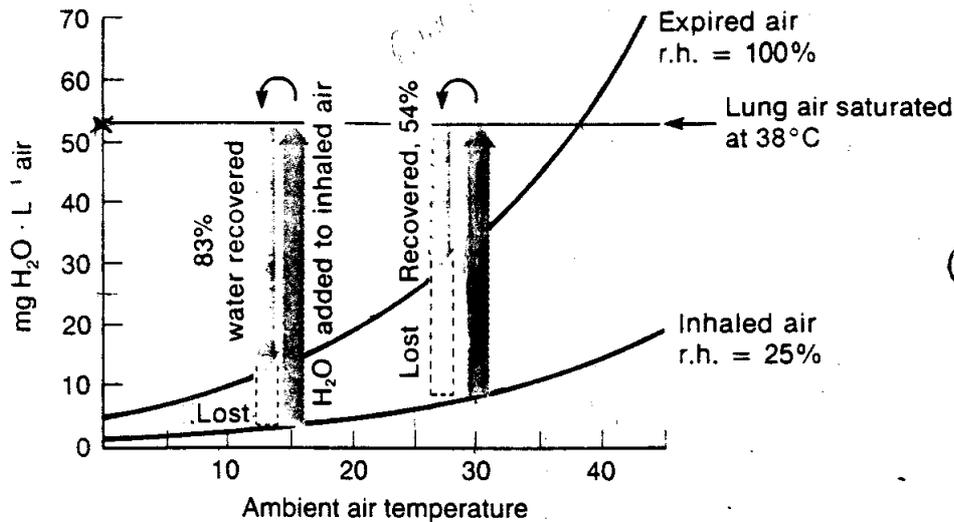


Fig.3.A perda de água através da respiração depende tanto relação entre a temperatura do corpo e a temperatura do ar inalado como com a umidade relativa do ar inspirado

A perda de água pelas fezes é minimizada graças à reabsorção retal de água e a eliminação de fezes desidratadas.

Desde que a regulação de água está intimamente associada à temperatura, certos hábitos encontrados em animais que vivem em regiões desérticas, como o rato canguru, estão associados a este fenômeno. Os seguintes hábitos são encontrados neste animal: *hábitos noturnos* – durante o dia permanecem em galerias onde a temperatura é relativamente mais baixa; *redução das atividades* – uma vez que a produção de calor é inevitável sempre que há contração muscular, o animal mantém-se em atividades reduzidas durante o dia.

A Fig. 4 resume as estratégias utilizadas pelo rato canguru para sobreviver num ambiente de grande restrição hídrica.

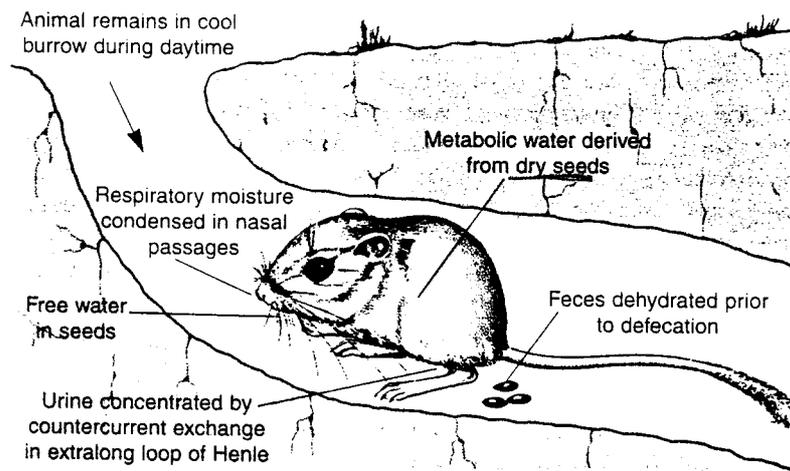


Fig.4. As estratégias utilizadas pelo rato-canguru para a conservação de água são características de muitos animais de pequeno porte, habitantes de desertos.

Produção de urina concentrada

Esta talvez seja a mais importante adaptação fisiológica do rato canguru. A concentração osmótica da urina deste animal é superior a 6000 mOsm/kg H₂O. É um valor elevado, embora valores superiores a 9000 mOsm/kg H₂O possam ser considerados em outros roedores de regiões desérticas. (Lembre-se que a concentração osmótica da urina humana varia de cerca de 60 a 1200 mOsm/kg H₂O) Rim capaz de produzir urina mais concentrada que o plasma só é encontrada em mamíferos e aves.

O "truque simples", como diz Schmidt-Nielsen, para a produção de urina concentrada reside num fenômeno conhecido com "efeito multiplicador de contra-corrente". Esquemas deste fenômeno são encontrados em praticamente todos os livros de fisiologia. No entanto, valeria a pena ressaltar que os elementos essenciais deste mecanismo são: (1) alça de Henle longa; (2) fluxo em sentido contrário nos dois ramos da alça; (3) transporte ativo; (4) um ramo que reabsorve ativamente soluto deve ser impermeável à água.

Discussão

1. Que relação há entre umidade relativa do ar e o balanço hídrico do rato canguru?
2. Que relação há entre a temperatura ambiente, balanço hídrico e temperatura corporal?
3. Em que o mecanismo de contra-corrente nasal difere do mecanismo multiplicador de contra-corrente encontrado no rim?
4. Em que se assemelha à coriza observada no ser humano nos dias frios com aquele observado nos animais com focinho frio?
5. Aves e mamíferos são capazes de produzir urina concentrada. Por que?

Bibliografia

- FYHN, H. J. Rodents. **In:** Maloiy, G. M. O. (Editor). *Comparative Physiology of Osmoregulation in Animal*. London, Academic Press, 1979, v. 2
- SALOMÃO, L.C. & LUNETTA, J.E. The effects of salinity changes on the osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Bol. Fisiol. Anim.*, **13**: 29-38, 1989
- SCHMIDT-NIELSEN, K. How animals work (1st edition). Cambridge University Press. 1988
- STUCCHI-ZUCCHI, A. & SALOMÃO, L. C. Effect of osmo-ionic concentration on the compound action potential of the cerebro-visceral connective of *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol.*, **101(A)**: 109-112.