

EDSON LUIZ DE OLIVEIRA

**CONTRAÇÃO DE MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE ANFÍBIO
INDUZIDA PELO EUGENOL: ESTUDOS DO MECANISMO DE AÇÃO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, sob orientação do Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre

**CURITIBA
2003**

À memória do meu inesquecível pai,
Carmelindo Luiz de Oliveira, meu exemplo
maior.

À minha mãe , Genirce Duarte de Oliveira,
com toda minha gratidão.

À minha esposa, Tereza Cristina, por tudo
que representa para mim.

Aos meus filhos Caroline e Leonardo, minha
renovação de vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, como sempre, pela vida, pelo amor e pelo sonho que nos brinda a cada dia, dando-nos força, esperança e motivação para prosseguirmos em nossa caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça e a Prof^a Dr^a Ilana Kassouf Silva, pela amizade e por terem demonstrado que para fazer pesquisa é necessário ética, paciência, dedicação, perseverança e principalmente humildade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo elevado grau de excelência das disciplinas que foram ministradas.

Ao Prof. Dr. Sílvio Sanches Veiga, pelos ensinamentos teóricos e práticos sobre Métodos utilizados em Biologia Celular para o estudo de proteínas e, em especial, pela amizade.

A toda equipe do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná que muito me auxiliou na obtenção e manutenção dos animais, utilizados neste trabalho.

A todos os funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná que muito contribuíram para a obtenção dos artigos científicos consultados para execução desse trabalho.

Ao amigo Marcos S. Lofrano-Alves, pelo auxílio e pelas valiosas discussões e críticas que muito contribuíram para enriquecer este trabalho.

A amiga Ana Cristina Hansaul, pela amizade e valiosa contribuição nos estudos realizados com músculo peitoral abdominal.

Aos amigos Fernando Dias Lavezzo e Ariani Szdularek, pela amizade e companheirismo cultivados e amadurecidos ao longo de nossa longa jornada de Trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia da Contração Muscular do Departamento de Fisiologia da UFPR: Gláucia Lunkmoss, Laura N. Zamproni, Deise Jaszczerski , César Augusto Lourenço Lima Filho, Adrianne Karla Bonilha, Esther Graff e Daniel Adami, meu muito obrigado.

A direção e coordenação do Curso e Colégio Terceiro Milênio, nas pessoas, dos professores Sergio Luís Freitas de Almeida e Daniela Kochanny Carvalho Weber que facilitaram meu horário de aulas, para que eu pudesse freqüentar, com assiduidade, as disciplinas ofertadas por este Programa de Pós-Graduação.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta etapa de minha formação.

SUMÁRIO	
Folhas de Apresentação	1-3
Agradecimentos	4-5
Sumário	6-9
Lista de Abreviaturas	10-12
Lista de Figuras	13-15
Lista de Tabelas	16
Resumos	17-18
Summary	19
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Estrutura e organização da fibra muscular esquelética	24
1.2 Proteínas associadas ao mecanismo de contração muscular	29
1.3 Acoplamento Excitação-Contração	39
1.4 Teorias do Mecanismo de Acoplamento Excitação-Contração	53
1.5 Substâncias utilizadas como ferramentas para o estudo do mecanismo Acoplamento Excitação- Contração	58
1.6 Objetivos	76
2. MATERIAIS E MÉTODOS	77
2.1 Obtenção e sacrifício dos animais	77
2.2 Músculo intacto de anfíbio	77
2.2.1. Experimentos realizados com eugenol em músculo intacto de anfíbio	79

2.2.2. Experimentos realizados com eugenol em músculo peitoral abdominal de anfíbio	80
2.2.3. Experimentos realizados com eugenol (10 mM) e nifedipina (100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), em músculo sartório intacto de anfíbio	81
2.2.4. Experimentos realizados com eugenol (10 mM), cafeína (10 mM) e procaína (10 mM), em músculo sartório intacto de anfíbio	82
2.2.5. Experimentos realizados com tetracaína (10 e 20 mM), cafeína (10mM) e eugenol (10 mM), em músculo sartório de anfíbio	83
2.2.6. Experimentos realizados com procaína (10 e 30 mM), cafeína (10 mM) e eugenol (1,3, 6 e 10 mM), em músculo peitoral abdominal intacto de anfíbio	84
2.2.7. Experimentos realizados com rianodina (100 μM), cafeína (10 mM) e eugenol (10 mM) ,em músculo peitoral abdominal intacto de anfíbio	85
2.2.8. Experimentos utilizando dantrole (5 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$) e/ou eugenol (6mM) ,em músculo peitoral abdominal intacto de anfíbio	86
2.3 Preparação da fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada pelo uso de saponina	87
2.3.1 Protocolo experimental	88
2.4. Preparação de fibra desmembranada com o uso de Triton X 100	90
2.5. Soluções	91
2.6. Reagentes químicos	94
2.7. Análise estatística	94
3. RESULTADOS	95
3.1 Efeito do eugenol (1, 3 e 10 mM) em músculo sartório isolado	95

de rã	
3.2. Efeito do eugenol (10 mM) em músculo sartório isolado de rã e resposta contráctil na presença do íon K^+ na concentração de 100 mM	95
3.3 Efeito do eugenol (1, 3 e 6 mM) ,em solução Ringer Normal, em músculo peitoral abdominal de rã	100
3.4. Efeito do eugenol (10 mM) ,em solução Ringer Normal ,em músculo peitoral abdominal de rã	100
3.5. Efeitos da nifedipina ($100 \mu g.ml^{-1}$) e da remoção do íon cálcio extracelular na contração induzida pelo eugenol (10 mM) ,em músculo sartório de rã	100
3.6. Efeitos da procaína na contração induzida pela cafeína (10 mM) ou eugenol (1, 3 e 10 mM) ,em músculo sartório de rã	101
3.7. Efeitos da tetracaína (10 mM), na contração induzida pela cafeína (10 mM) e pelo eugenol (10 mM), em músculo sartório de rã	110
3.8. Efeito da tetracaína (10 e 20 mM) na contração induzida pelo eugenol (10 mM) em músculo sartório de rã	110
3.9. Efeito do eugenol (10 mM) e da cafeína (10 mM), , em músculo peitoral abdominal intacto de rã após incubação com procaína (10 ou 30 mM)	111
3.10. Efeito da procaína (30 mM), na contração induzida pelo eugenol (1, 3 e 6 mM), em feixes de músculo peitoral abdominal de rã	118
3.11. Efeitos da rianodina ($100 \mu M$) na contração induzida pela cafeína (10 mM) e eugenol (10 mM) em músculo intacto peitoral abdominal de rã	118
3.12. Efeitos do dantrolene ($5 mg.ml^{-1}$) na contração induzida pelo eugenol (6 mM) em músculo intacto peitoral abdominal de rã	119
3.13. Liberação de Ca^{2+} induzida pelo eugenol em fibra muscular esquelética permeabilizada por saponina	120

3.14. Efeitos da tetracaína (1 mM), nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM) e eugenol (5 mM), em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina	129
3.15. Efeitos da neomicina (10 mM) nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM) ou eugenol (5 mM), em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina	129
3.16. Inibição das contrações induzidas pela cafeína (30 mM) e eugenol (5 mM) pelo vermelho de rutênio em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina	130
3.17. Efeitos da rianodina (200 μ M) nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM) e eugenol (5 mM) em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina	131
3.18. Inibição pela heparina (2,5 mg.ml ⁻¹), da liberação de Ca ²⁺ induzida pelo eugenol (5 mM) em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina	140
3.19. Efeitos do eugenol (1, 5 e 10 mM) na força máxima de contração em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por Triton X-100	141
4. DISCUSSÃO	146
5. CONCLUSÕES	157
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158

LISTA DE ABREVIATURAS

[³H] RyR: rianodina tritiada

[³H]: trítio

[Ca²⁺]: concentração iônica de cálcio

A: actina

ADP: difosfato de adenosina

AEC: Acoplamento Excitação-Contração

Arg: aminoácido arginina

ATP: adenosina trifosfato

BES: ácido N,N-bis (2hidroxietil-2-aminoetanosulfônico)

Ca²⁺ : íon cálcio

Ca²⁺₅₀ : concentração do íon cálcio necessária para obtenção de 50% da força de contração muscular

CaCl₂: cloreto de cálcio

CHAPS: 3-3[(3 colamidopropil) dimetilamônio]-propanosulfonato

CICR: cálcio induz liberação de cálcio

Cl⁻: íon cloreto

Cl₅₀ : concentração de íon cloreto necessária para inibir em 50% a resposta contrátil do músculo

DHP : diidropiridínico

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EGTA: ácido etileno bis(β-amino etil éter N,N,N',N' tetracético)

FME: fibra muscular esquelética

HCl: ácido clorídrico

HMM: meroniosina de cadeia pesada

InsP₃: trifosfato de inositol

K: concentração de íon potássio necessária para obtenção de 50% da força de contração muscular

K⁺: íon potássio

[K⁺]: concentração iônica de potássio

KCl: Cloreto de potássio

K_D : constante de dissociação

kDa: quilodalton

$KMSO_3$: metanosulfonato de potássio

KOH: hidróxido de potássio

LC1: cadeia leve 1 da miosina

LC2: cadeia leve 2 da miosina

Lis: aminoácido lisina

Mg^{2+} : íon magnésio

$MgCl_2$: cloreto de magnésio

N: constante relacionada com a inclinação da curva força de contração/concentração de íons cálcio

n: número de experimentos

Na^+ : íon sódio

NaCl: cloreto de sódio

pCa: $-\log[H^{2+}]$

pH: $-\log[H^+]$

Pi: fosfato ionorgânico

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

Po: probabilidade de abertura

R100: Solução Ringer 100 ($[K^+] = 100$ mM de K^+)

R4: Solução de Ringer Normal ($[K^+] = 4$ mM de K^+)

RDHP: receptores diidropiridínicos

RS: retículo sarcoplasmático

RyR: receptores rianodínicos

S1: subfragmento S1 da miosina

SHM: Síndrome da hipetermia maligna

Solução A: solução para se obter a força contrátil máxima

Solução C: solução de carregamento

Solução E: solução para lavar a fibra com EGTA 0,5 mM

Solução R: solução de relaxamento

Tm: tropomiosina

Tn: troponina

TnC: troponina C

TnI: troponina I

TnT: troponina T

TRIS: Tris-(hidroxymethyl)-aminomethane

μm : micrômetro (10^{-6} m)

Lista de Figuras	
Figura 1- Eventos relacionados ao fenômeno da contração muscular	23
Figura 2- Estrutura da fibra muscular estriada esquelética, mostrando as invaginações do sarcolema (túbulos), as miofibrilas e o retículo sarcoplasmático	24
Figura 3- Diagrama ilustrando a organização do músculo estriado esquelético	28
Figura 4- Estrutura da molécula de miosina	29
Figura 5- Desenho esquemático representando as moléculas de actina G e actina F	31
Figura 6- Arranjo molecular da troponina (Tn), tropomiosina (Tm) e actina em filamentos finos de fibras musculares estriadas esqueléticas	32
Figura 7- Diagrama esquemático representando a molécula de troponina C	34
Figura 8- Modelo do bloqueio estérico	38
Figura 9- Subunidades dos receptores DHP	41
Figura 10- Modelo esquemático da subunidade $\alpha 1$ dos RDHP	43
Figura 11- Estrutura dos receptores RyR	47
Figura 12- Modelo esquemático dos receptores rianodínicos	48
Figura 13- Efeitos do eugenol (1, 3 e 10 mM) em músculo sartório isolado de rã	96
Figura 14- Efeito do eugenol (10 mM) em músculo sartório isolado de rã e resposta contrátil na presença do íon K^+ na concentração de 100 mM	98
Figura 15- Efeito do eugenol (1, 3 e 6 mM) em músculo peitoral abdominal de rã	102

Figura 16- Efeito do eugenol (10 mM) em músculo peitoral abdominal de rã	104
Figura 17- Avaliação dos efeitos da nifedipina (100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e da remoção do íon cálcio extracelular na contração induzida pelo eugenol (10 mM), em músculo sartório de rã	106
Figura 18- Efeitos da cafeína (10 mM) e do eugenol (1, 3 e 10 mM), em músculo sartório de rã após incubação com procaína (10 mM)	108
Figura 19- Efeitos da tetracaína (10 mM), no encurtamento muscular induzido pela cafeína (10 mM) e pelo eugenol (10 mM) em músculo sartório de rã	112
Figura 20- Efeito da tetracaína (10 e 20 mM), na contração induzida por eugenol (10 mM), em músculo sartório de rã	114
Figura 21- Análise do efeito da procaína (10 mM), na contração induzida pela cafeína (10 mM) e pelo eugenol (10 mM) em músculo peitoral abdominal de rã	116
Figura 22- Efeito da procaína (30 mM) na contração induzida pelo eugenol (1, 3 e 6 mM), em feixes de músculo peitoral abdominal de rã	121
Figura 23- Efeito da rianodina (100 μM) na contração induzida pela cafeína (10 mM) ou eugenol (10 mM), em feixes de músculo peitoral abdominal de rã	123
Figura 24- Efeitos do dantrolene (5 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$), na contração induzida pelo eugenol (6 mM) em músculo peitoral abdominal de rã	125
Figura 25- Efeito do eugenol (5 mM), ou da cafeína (30 mM) na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático de fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina	127
Figura 26- Efeitos da tetracaína (1 mM), nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM), ou eugenol (5 mM), em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina	132
Figura 27- Inibição pela neomicina (10 mM), das contrações induzidas pela cafeína (30 mM), ou eugenol (5 mM) em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina	134
Figura 28 - Inibição das contrações induzidas pela cafeína (30 mM) ou eugenol (5 mM) obtida pelo vermelho de rutênio em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina	136

Figura 29- Efeitos da rianodina (200 μM), nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM), ou pelo eugenol (5 mM), em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina	138
Figura 30- Heparina (2,5 mg.ml^{-1}), inibe a liberação de Ca^{2+} induzida pelo eugenol (5 mM), mas não suprime a contração promovida pela cafeína (30 mM), em fibra muscular esquelética permeabilizada por saponina	142
Figura 31- Efeito do eugenol (1, 5 e 10 mM), na relação força contrátil/ $[\text{Ca}^{2+}]$ em fibra muscular esquelética permeabilizada por Triton X 100	144

Lista de tabelas	
Tabela 1: Composição das soluções utilizadas em preparações com músculo intacto isolado de anfíbio. Concentrações estão expressas em mM	92
Tabela 2: Composição das soluções (mM), calculada pelo programa MS and BES (turbo 87 versão 3.0), utilizadas para os protocolos experimentais realizados com fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina ou Triton X 100	93
Tabela 3: Representação dos volumes de mistura de soluções pCa 7,0 e pCa 5,0 (em ml), empregada para o preparo das soluções de pCa^{2+} de 6,6 a 5,2 utilizadas em experimentos de fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por Triton X 100	94

Resumo

Usando-se como modelos experimentais os músculos sartório e peitoral abdominal isolados de rã e de fibras musculares quimicamente permeabilizadas por saponina ou Triton X 100, investigou-se os efeitos do óleo aromático eugenol no mecanismo de liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático e no sistema contrátil. Avaliou-se a ação de diferentes antagonistas de canais de Ca^{2+} na contração promovida pelo eugenol, comparando-se esses efeitos aos induzidos pela cafeína.

Nos experimentos utilizando músculo intacto foi observado que:

- 1) A contração promovida pelo eugenol, em músculo sartório, foi observada tanto em solução de Ringer Normal ($[\text{K}^+] = 4 \text{ mM}$ de K^+) quanto em solução de Ringer 100 ($[\text{K}^+] = 100 \text{ mM}$ de K^+).
- 2) O eugenol (1, 3 e 10 mM) em solução de Ringer Normal, induziu contração, em músculo peitoral abdominal.
- 3) A nifedipina ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), na ausência de Ca^{2+} no líquido extracelular não promoveu bloqueio da contração induzida pelo eugenol ou pela cafeína.
- 4) Os anestésicos locais, tetracaína (10 ou 20 mM) e procaína (10 ou 30 mM), determinaram bloqueio da contração promovida pela cafeína (10 mM), mas não bloquearam a contração induzida pelo eugenol, tanto em músculo sartório como em peitoral abdominal.
- 5) A rianodina ($100 \mu\text{M}$) ou o dantrolene ($5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), promoveram bloqueio da contração induzida pelo eugenol em músculo peitoral abdominal mantido em solução de Ringer Normal.

Em fibras permeabilizadas com saponina observou-se que:

- 1) O eugenol (1, 5 e 10 mM), independente do tipo de músculo estudado induziu liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático.
- 2) A tetracaína (1 mM), promoveu bloqueio da contração induzida pela cafeína (30 mM), mas não aboliu a contração induzida pelo eugenol.
- 3) A neomicina (10 mM), determinou bloqueio da contração induzida tanto pelo eugenol quanto pela cafeína.

- 4) O vermelho de rutênio ($10\mu\text{M}$), inibiu a contração induzida tanto pelo eugenol como pela cafeína
- 5) A rianodina ($200\ \mu\text{M}$), promoveu completo bloqueio da contração induzida pela cafeína, mas inibiu parcialmente a contração promovida pelo eugenol
- 6) Heparina ($2,5\ \text{mg.ml}^{-1}$), um bloqueador dos receptores InsP_3 , promoveu marcante bloqueio da contração induzida pelo eugenol, mas não alterou a contração induzida pela cafeína.

Em fibras permeabilizadas com Triton X 100 observou-se que:

- 1) O eugenol não alterou a sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio ou a força contrátil máxima das fibras.

Esses dados sugerem que:

- 1) A contração induzida pelo eugenol envolve, supostamente (pelo menos), dois mecanismos de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático: um relacionado com ativação dos receptores rianodínicos e outro através de uma via sensível a heparina.

Summary

The effects of eugenol in intact muscle (sartorius and peitoral abdominalis), on the sarcoplasmic reticulum (SR) and contractile apparatus of chemically skinned fibers of the frog were investigated. In intact muscle fibers, eugenol (3, 6 and 10 mM) induced contraction by itself. This effect was blocked by dantrolene and ryanodine. The contractions induced by eugenol were not blocked by procaine, tetracaine or Normal Ringer solution containing nifedipine with no calcium added. Both local anesthetics, but not nifedipine blocked caffeine-induced muscle contraction. In saponin-skinned fibers, eugenol (5 mM) induced muscle contraction probably by releasing Ca^{2+} from the SR. In saponin-skinned fiber, tetracaine (1 mM) completely inhibited caffeine-induced contraction, but did not alter the contractures induced by eugenol. Neomycin (10 mM) strongly inhibited eugenol and caffeine - induced contraction. Ruthenium red (10 μM), inhibited both caffeine and eugenol-induced muscle contractions. Ryanodine (200 μM), a specific ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel blocker, promoted a complete inhibition of the contractions induced by caffeine, but only partially blocked the contractions induced by eugenol. Heparin (2.5 mg.ml^{-1}), an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP_3) receptors blocker, strongly inhibited the contractions induced by eugenol but had small effect on the caffeine-induced contractions. Eugenol neither altered the Ca^{2+} sensitivity nor the maximal force in Triton X-100 skinned muscle fibers. These data suggest that the muscle contraction induced by eugenol involves at least two mechanisms of Ca^{2+} release from the SR: one related to the activation of the ryanodine receptors and another through a heparin-sensitive pathway.

1 INTRODUÇÃO

Os fenômenos de motilidade representam uma propriedade intrínseca indispensável a todas formas de vida. Nos vertebrados, correr, saltar, caminhar, nadar e voar dependem da ação da musculatura estriada esquelética. Alguns movimentos involuntários, como batimentos cardíacos e o peristaltismo do tubo gastrintestinal são dependentes, respectivamente, da atividade da musculatura estriada cardíaca e lisa. O músculo cardíaco e a musculatura lisa apresentam células dotadas de estruturas diferentes e características funcionais distintas daquelas observadas no músculo esquelético (MOSS e HOFMANN, 1992; STEVENS e LOWE, 1995).

O fenômeno da contração do músculo estriado esquelético encontra-se, em condições fisiológicos, controlado pela atividade do Sistema Nervoso Central através da inervação motora (motoneurônio) e depende de uma série de integrações para que seu papel na motricidade seja exercido de modo coordenado.

Quando o potencial de ação gerado no motoneurônio trafega e alcança a região pré-sináptica, há ativação de canais de cálcio situados na porção terminal do motoneurônio. Esses canais de cálcio, que são voltagem dependentes, são ativados e promovem influxo de íons Ca^{2+} para o interior do terminal nervoso (LEVITAN e KACZMAREK, 1997).

O aumento da concentração intracelular de cálcio será responsável pela exocitose de vesículas contendo o mediador químico acetilcolina, que será então liberado na fenda sináptica. A acetilcolina poderá se difundir para áreas adjacentes sendo degradada pela acetilcolinesterase ou se ligar a receptores para esse neurotransmissor, denominados receptores nicotínicos, presentes na membrana pós-sináptica (MARBAN *et al.*, 1998).

O receptor é um grande complexo protéico com massa molecular de 275 kDa, formado por cinco subunidades protéicas. Essas proteínas apresentam uma distribuição topográfica na membrana pós-sináptica, funcionando como canal operado por ligante, ou seja, operado pelo neurotransmissor (HILLE, 1992).

A ligação do neurotransmissor ao receptor promove aumento da condutância do canal que permitirá o influxo de íons sódio a favor do seu gradiente eletroquímico. Como esse canal não é seletivo ao íon sódio, efluxo de íons potássio também ocorrerá através dos mesmos. O influxo de íons Na^+ será maior que o efluxo de íons K^+ porque o gradiente eletroquímico o Na^+ é maior do que para o K^+ . O resultado de tais eventos manifesta-se pela despolarização da membrana pós-sináptica. Se esta despolarização da placa alcançar o potencial limiar, potenciais de ação serão originados. Esses se propagarão com grande velocidade tanto longitudinalmente quanto radialmente, para toda fibra muscular (HILLE, 1992).

O sarcolema das fibras musculares esqueléticas é dotado de invaginações que se projetam perpendicularmente ao eixo longitudinal da fibra. Tais invaginações constituem o sistema tubular transverso, que é de fundamental importância para que a onda de despolarização, que percorre o sarcolema, atinja regiões mais internas da célula muscular, ou seja, propague-se para o centro da fibra (MOSS e HOFMANN, 1992).

Na membrana do sistema tubular transverso, existem proteínas que são sensíveis à variação de potencial transmembrana. Como a essas proteínas ligam-se especificamente drogas do grupo das diidropiridinas, tais proteínas são denominadas de receptores diidropiridínicos (RDHP). Esses receptores funcionam também como canais lentos de íons cálcio (canais do tipo L) (RIOS e BRUM, 1987).

Os receptores DHP estão intimamente associados à proteínas presentes na membrana da cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (RS). Devido a grande afinidade do alcalóide rianodina por essas proteínas, essas são denominadas receptores rianodínicos (RyR). Os RyR funcionam como canais liberadores de cálcio do retículo sarcoplasmático (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; LAMB, 2000; FIIL e COPELLO, 2002)

A onda de despolarização, que percorre o sarcolema, alcança o sistema tubular transverso e determina modificações conformacionais dos RDHP, as quais determinam alteração na condutância dos receptores rianodínicos, promovendo,

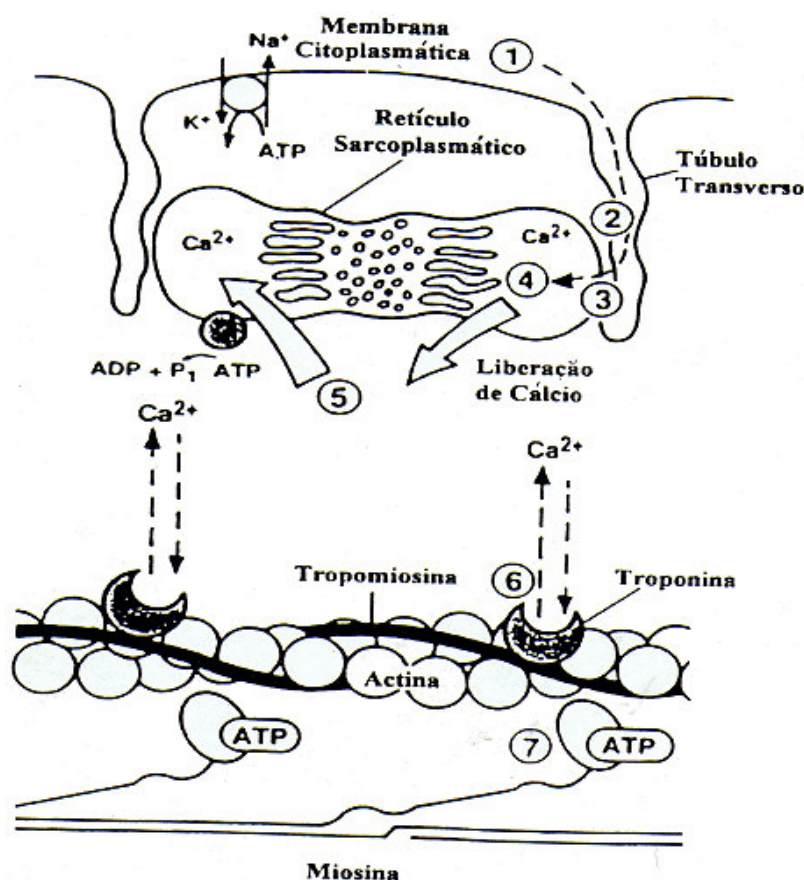
assim, saída de Ca^{2+} dos estoques situados na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (LEONG e MACLENNAN, 1998; DULHUNTY, 2002). Esse mecanismo é conhecido como acoplamento excitação-contração e suas principais características estão ilustradas na Figura 1.

A quantidade de íon cálcio liberado é suficiente para aumentar a concentração desse íon de 10^{-8} M (em condições de repouso) para níveis de até 10^{-5} M, observados em condições de estimulação tetânica. Esse íon liga-se aos sítios de baixa afinidade presentes na molécula de troponina C, promovendo uma modificação conformacional de sua estrutura. Com isso, há alteração da posição do complexo troponina-tropomiosina, permitindo que ocorram interações cíclicas da cadeia pesada da miosina (cross-bridges ou pontes cruzadas) com os filamentos finos de actina, resultando em produção de força e/ou encurtamento dos sarcômeros (RÜEGG, 1988).

O relaxamento muscular ocorre após a liberação de íons cálcio ter sido interrompida pela repolarização da membrana do túbulo T (desativação do sensor de voltagem) ou por uma inativação do sensor durante as despolarizações de longa duração (MELTZER *et al.*, 1995). Contudo, é fundamental destacar que o fenômeno elétrico não coincide no tempo com o fenômeno mecânico, pois a despolarização antecede o início do fenômeno contrátil, enquanto a repolarização também antecede o relaxamento muscular.

Os íons cálcio, no músculo esquelético, são recaptados para a porção longitudinal do retículo sarcoplasmático através da atividade de uma enzima Ca^{2+} -ATPase dependente de Mg^{2+} . Essa recaptação reduz a concentração citosólica de Ca^{2+} , permitindo assim a dissociação dos íons cálcio da troponina C e a conseqüente desativação das pontes cruzadas (MACLENNAN *et al.*, 1997). Admite-se também que no mioplasma exista uma proteína, denominada parvalbunina, que desempenhe importante papel no tamponamento do Ca^{2+} (RALL, 1996). O cálcio recaptado na porção longitudinal é direcionado para a cisterna terminal do RS onde permanece, em sua maior parte, ligado a calsequestrina, uma glicoproteína que se liga fracamente a esses íons e participa da sua estocagem do mesmo (FRANZINI-ARMSTRONG e JORGENSEN, 1994).

FIGURA 1 - EVENTOS RELACIONADOS AO FENÔMENO DA CONTRAÇÃO MUSCULAR



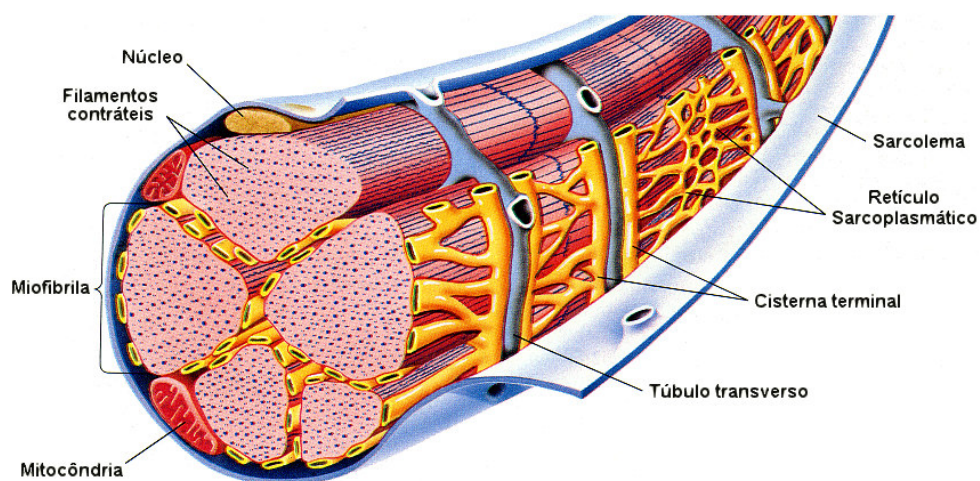
FONTE: FITTS, R.H.; MEZTGER, J. M. Mechanisms of muscular fatigue. In: _____ **Principle of exercise biochemistry**. Karger: Basel, 1988. v.27. p. 121-229.

NOTA: Os números indicam os eventos relacionados com o processo: 1, excitação da membrana plasmática (sarcolema); 2, despolarização do sistema tubular transverso; 3, acoplamento entre o sensor de voltagem (receptores diidropiridínicos) e a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático por meio dos canais de cálcio (receptores rianodínicos); 4, liberação do íon cálcio pelo retículo sarcoplasmático; 5, recaptação dos íons Ca^{2+} (re-uptake) através da bomba de cálcio dependente de ATP localizada na membrana do retículo sarcoplasmático; 6, ligação do Ca^{2+} à troponina 7; ligação da miosina com a actina, hidrólise do ATP , desenvolvimento de força pelas pontes cruzadas .

1.1 Estrutura e organização da fibra muscular esquelética

As fibras da musculatura estriada esquelética são formadas durante a embriogênese pela fusão de muitas células precursoras, denominadas mioblastos (STEVENS e LOWE, 1995), assumindo um aspecto cilíndrico e multinucleado com núcleos localizando-se periféricamente, logo abaixo do sarcolema (Figura 2) (GEORGE e CASTRO, 1998).

FIGURA 2. ESTRUTURA DA FIBRA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA, MOSTRANDO AS INVAGINAÇÕES DO SARCOLEMA (TÚBULOS), AS MIOFIBRILAS E O RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO.



FONTE : GARRETT, R. H. ; GRISHAM, C. M. . Muscle Contraction. In : _____. Molecular **Aspects of Cell Biology**. Saunders College Publishing, 1992. p. 1158.).

Invaginações membranosas, representando extensões da membrana celular, estão presentes em intervalos regulares ao longo do sarcolema (GARRET e GRISHAN, 1995). Essas invaginações membranosas são denominadas túbulos transversos ou túbulos T (SHOSHAN-BARTMATZ e ASHLEY, 1998). Na membrana dos túbulos T, como mencionado inicialmente, encontram-se os receptores DHPR que atuam como sensores de voltagem.

Internamente há um sistema de membranas denominado retículo sarcoplasmático. Esse sistema está intimamente relacionado com a estocagem intracelular de íons cálcio no músculo estriado esquelético, bem como com sua liberação, através de canais específicos, denominados receptores rianodínicos (RyR) (FRANZINI-ARMSTRONG e JORGENSEN, 1994) e com sua recaptação por meio de uma Cálcio-ATPase (IKEMOTO, 1982).

O retículo sarcoplasmático é constituído por duas regiões, denominadas túbulos longitudinais e cisternas terminais. Os túbulos longitudinais percorrem paralelamente o sarcômero, enquanto as cisternas terminais, estão em íntima justaposição com os túbulos T (BLOCK *et al.*, 1988). O conjunto formado por duas cisternas terminais, separadas por um túbulo T é denominado tríade (BLOCK *et al.* 1988; MELTZER *et al.*, 1995; FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; SHOSHAN-BARMATZ e ASHLEY, 1998). Essa organização é de suma importância para o mecanismo de acoplamento excitação-contração, como será discutido adiante.

A função mecânica da fibra muscular é desempenhada graças a presença de miofibrilas (Figura 3) que são estruturas cilíndricas que possuem diâmetro de 1 a 2 μm e correm longitudinalmente à fibra muscular.

As miofibrilas, ao microscópio de luz, aparecem com estriações transversais, pela alternância de faixas claras e escuras (HUXLEY e HANSON, 1954), e essas estriações decorrem das repetições de unidades iguais denominadas sarcômeros. Analisando as miofibrilas em microscópio de polarização (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995), observa-se que as faixas escuras são anisotrópicas, sendo denominadas de banda A, enquanto as faixas claras, bandas I, são isotrópicas. No centro de cada banda I aparece uma linha transversal escura, denominada linha Z (HUXLEY e HANSON, 1954; HUXLEY, 1957).

Cada sarcômero é formado pela parte da miofibrila que fica entre duas linhas Z sucessivas e contém uma banda A separando suas semibandas, ou seja, cada sarcômero compreende $1/2$ faixa I + faixa A + $1/2$ faixa I. Cada banda A

apresenta uma zona mais clara no seu centro, a banda H, que contém um disco central M, também denominado linha M (GARRET e GRISHAN, 1995).

A linha Z apresenta como componente primário a proteína α -actinina. Essa proteína possui massa molecular de 200 kDa, sendo constituída de duas cadeias polipeptídicas antiparalelas (STROMER, 1992; SORIMACHI *et al.*, 1997), e estudos , utilizando isoformas dessa proteína, demonstram que as duas subunidades antiparalelas de um homodímero fixam-se a molécula de actina por meio de suas terminações amino (N), ao passo que, as terminações carboxi C estão ligadas as moléculas de conectina presentes na linha Z (OHTSUKA *et al.*, 1997).

Admite-se que essas interações sejam fundamentais para a ancoragem de sarcômeros adjacentes e para a ligação das moléculas de conectina, situadas nas metades opostas de sarcômeros adjacentes (YOUNG *et al.*, 1998).

Na linha Z existe, também, uma proteína denominada capZ (β -actinina) (CASELLA *et al.*, 1987), que atua como elemento estabilizador da polimerização dos filamentos de actina, pois ao estabilizar a polimerização da actina e ligar-se as terminações livres dessa proteína , previne a adição ou a perda de monômeros de actina (PAPA *et al.*, 1999)

As bandas I são adjacentes as linhas Z e apresentam filamentos finos constituídos por actina e outras proteínas associadas. Cada filamento fino encontra-se ligado à linha Z por suas extremidades, sendo mantidos num arranjo semelhante a uma malha quadriculada (ALBERTS *et al.*, 1994). Os filamentos finos estendem-se através da banda I penetrando na banda A (MOSS e HOFMANN, 1992). Associado aos filamentos finos, dentre outras proteínas, existe uma denominada nebulina (SHIH *et al.*, 1997) cuja massa molecular varia de 600 a 900 kDa dependendo do tecido, da espécie e do estágio de desenvolvimento do músculo (STROMER, 1992).

Essa proteína consiste quase exclusivamente de um motivo repetitivo de 35 aminoácidos, presente em número suficiente para se estender desde uma extremidade do filamento até a outra. E admite-se que a mesma atue como uma

“régua molecular” que regularia a organização da actina e o comprimento dos filamentos finos durante o desenvolvimento do músculo (MILLEVOI *et al.*, 1998).

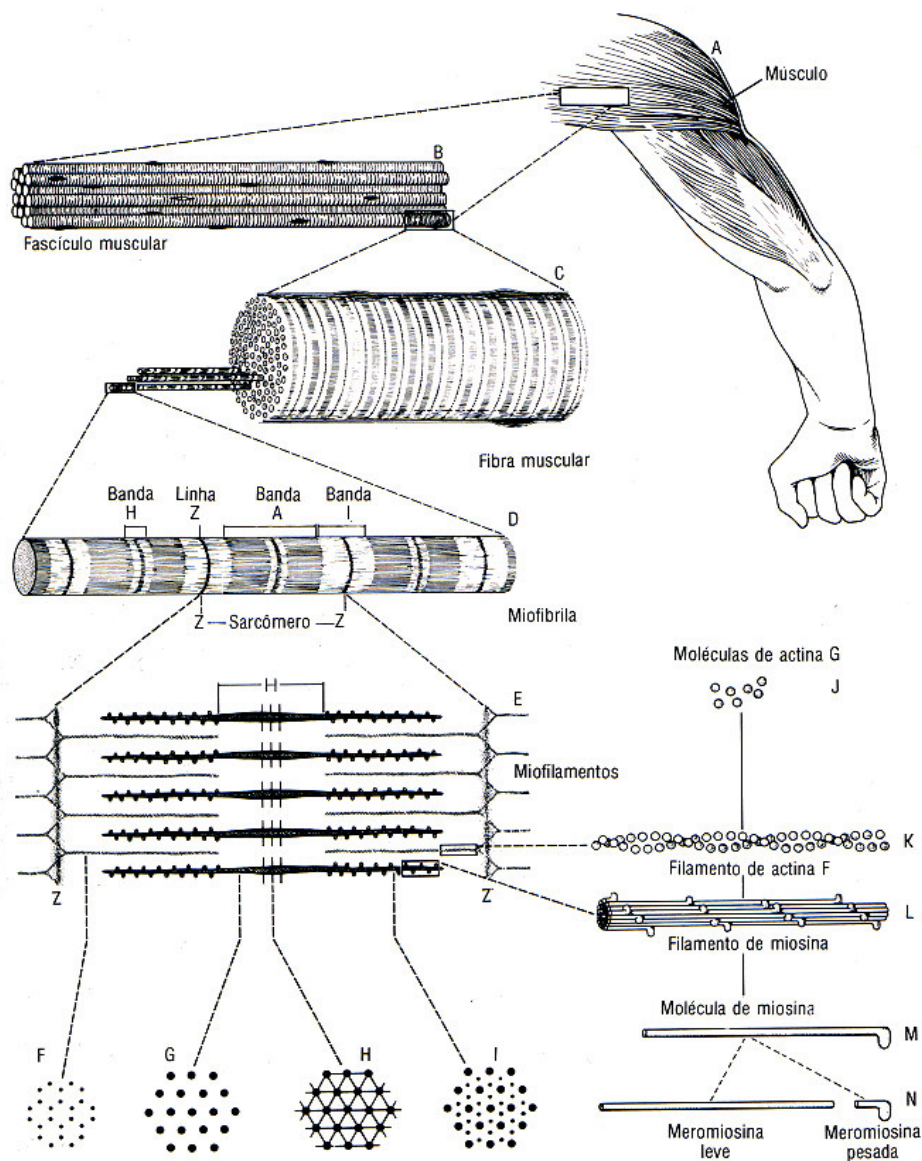
A banda A localiza-se centralmente no sarcômero e apresenta filamentos grossos constituídos por miosina, bem como a porção final dos filamentos finos. Nessa região os filamentos grossos (miosina) estão organizados numa trama hexagonal, com filamentos finos (actina) distribuídos regularmente entre eles. Os filamentos grossos de miosina estão ligados a uma proteína denominada conectina, também conhecida por titina (PECKHAM *et al.*, 1997). A conectina é um longo polipeptídeo, que geralmente apresenta-se formada por duas unidades designadas de T1 e T2 e apresentando massa molecular de cerca de 3000 kDa. (MARUYAMA, 1997). As moléculas de conectina têm a forma semelhante a uma corda e se estendem desde os filamentos grossos até o disco Z; imagina-se que funcionem como molas mantendo os filamentos grossos centralizados no sarcômero (MARUYAMA, 1997).

A zona H situa-se no centro do sarcômero e representa a região da banda A que não contém nenhum filamento fino (MOSS e HOFMANN, 1992).

A linha M representa a estrutura mais central do sarcômero e contém proteínas específicas, tais como a proteína M e miomesina (GROVE *et al.*, 1984), bem como a MM- creatina quinase (STROMER, 1992). Estas proteínas estendem-se radialmente, ligando-se aos filamentos grossos adjacentes (GARRET e GRISHAN, 1995).

É importante destacar que muitas outras proteínas estão presentes nas fibras musculares atuando como componentes dos filamentos intermediários (desmina e vimetina) bem como relacionadas a adesão, tais como espectrina, vinculina, anquirina, distrofina e talina, que são fundamentais para a estruturação e organização das miofibrilas e acabam apresentando um importante papel nos aspectos funcionais do músculo esquelético (STROMER, 1995; YANG *et al.*, 1996). Assim, em uma fibra estriada esquelética há um conjunto complexo de proteínas que atuam como contrácteis, regulatórias e componentes do citoesqueleto.

FIGURA 3 - DIAGRAMA ILUSTRANDO A ORGANIZAÇÃO DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO.



FONTE: JUNQUEIRA, L. C. ; CARNEIRO, J. Tecido Muscular. In:_____.

Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 163.

NOTA: Neste diagrama observa-se a disposição longitudinal das fibras musculares que são constituídas de milhares de miofibrilas. Cada miofibrila é constituída pela repetição de unidades denominadas sarcômeros.

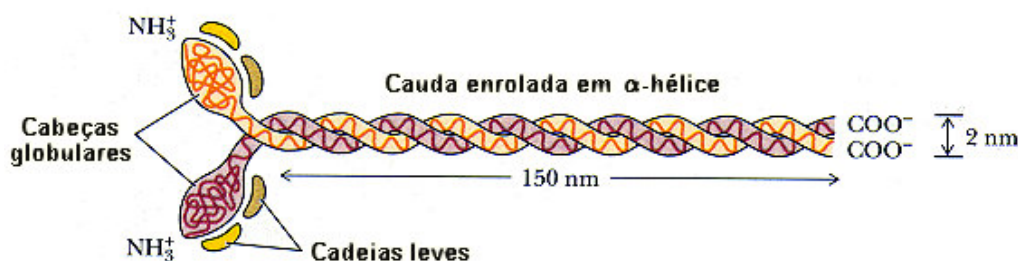
1.2 Proteínas associadas ao mecanismo de contração muscular

O evento da contração depende da interação cíclica das pontes transversas de actina e miosina presentes, respectivamente, nos filamentos finos e grossos. Cada uma dessas proteínas apresenta propriedades e características específicas.

O filamento grosso representa o polímero bipolar da proteína motora miosina que interage com a actina para a produção de força e/ou encurtamento do músculo. Esse filamento também contém outras proteínas, tais como as proteínas C, H, X, M, cujas funções não estão completamente esclarecidas, e a proteína conectina (titina) (OFFER *et al.*, 1973; STARR *et al.*, 1985).

A molécula de miosina é assimétrica e possui massa molecular de aproximadamente 540 kDa, sendo constituída de seis polipeptídeos (Figura 4). Esses incluem duas cadeias pesadas com cerca de 230 kDa, bem como dois pares de diferentes cadeias leves com massa molecular situada entre 15-25 kDa, sendo denominadas cadeias leves LC1 e LC2. (SQUIRE, 1981). Tais cadeias são designadas, respectivamente, de essencial e regulatória. Acredita-se que a cadeia leve essencial esteja envolvida na regulação da contração em diversos tipos de músculos (liso e de invertebrados) e a cadeia leve regulatória module a atividade ATPásica da actomiosina (GORDON *et al.*, 2000).

FIGURA 4 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE MIOSINA.



FONTE: GARRETT, R. H. ; GRISHAN, C. M. Muscle contraction. In: _____ **Molecular Aspects of Cell Biology**. Orlando: Saunders College Publishing, 1995. p. 1161.

O tratamento da cadeia pesada com tripsina, como demonstrado por Andrew Szent-Györgi em 1953 (GARRET e GRISHAM, 1995), produz dois fragmentos denominados meromiosina (HMM) pesada e meromiosina leve (LMM) (SQUIRE, 1981, COOKE, 1997).

A HMM possui a cabeça globular (S1) e um bastão flexível denominado S2 que une S1 ao restante da molécula de miosina. A LMM, por sua vez, é um bastão rígido que forma o cerne dos filamentos grossos. (HARRINGTON E RODGERS, 1984).

Na molécula de miosina duas cadeias pesadas se associam por enrolamento de seus domínios α - helicoidais, formando um dímero estável que possui duas cabeças e uma única cauda em forma de bastão. A cauda é responsável pela agregação da miosina para formar a parte estrutural dos filamentos grossos, enquanto a cabeça da miosina apresenta sítios de ligação para o ATP e atividade ATPase, bem como um sítio de ligação para actina e sítios de ligação para diversos cátions divalentes (IWANE *et al.*, 1997). Dependendo das concentrações intracelulares de cálcio e do estado do nucleotídeo (ATP) que estaria ligado à cabeça da miosina, esta poderia variar sua posição de 90° para 45° (em relação à S2) e esta mudança determinaria a geração de força e/ou deslizamento dos filamentos (GORDON *et al.*, 2000).

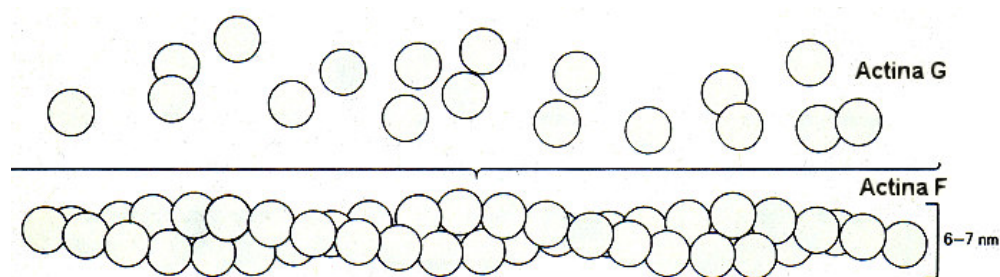
Os filamentos finos da fibra muscular estriada esquelética que estão ancorados na linha Z, são formados pela associação da actina, da tropomiosina e do complexo troponina (Figura 5), na razão molar de 7:1:1 (POTTER, 1974), e representam o principal sítio para o mecanismo de regulação exercido pelos íons cálcio no processo da contração muscular (GORDON *et al.*, 2000; CHALOVICH, 2002).

A actina (Figura 5), representa o componente mais abundante dos filamentos finos (COLLINS e ELZINGA, 1975). Sob condições de baixa força iônica, essa proteína existe na forma de uma proteína globular (monômero), denominada actina G, com massa molecular de 42 kDa e formada por 365 resíduos de aminoácidos. Em condições fisiológicas (alta força iônica, $\cong$ 200 mM) e na presença de Mg^{2+} -ATP, os monômeros de actina G polimerizam-se

originando um longo filamento denominado actina F. Essa é constituída por duas cadeias de monômeros globulares (actina G), torcidas uma sobre a outra, em hélice dupla, como um colar de duas fileiras de contas (MURRAY *et al.*, 1993).

O filamento de actina F apresenta entre 6 e 7 nm de espessura e possui uma seqüência repetitiva de monômeros a cada 35.5 nm, formando uma torção completa a cada 72 nm, sendo que quatorze monômeros de actina formam um passo do filamento helicoidal. Os filamentos de actina apresentam-se fixos a linha Z por suas extremidades, sendo mantidos num arranjo malha quadriculado (MURRAY *et al.*, 1993).

FIGURA 5 - DESENHO ESQUEMÁTICO REPRESENTANDO AS MOLÉCULAS DE ACTINA G E ACTINA F.



FONTE : MURRAY, R.K. . Muscle. In: MURRAY, R.K.; GRANNER, D.R.; MAYES, P.A; RODWELL, V.W. **Harper's Biochemistry**. 23^o edition. USA : Prentice-Hall International Inc., 1993. p. 650

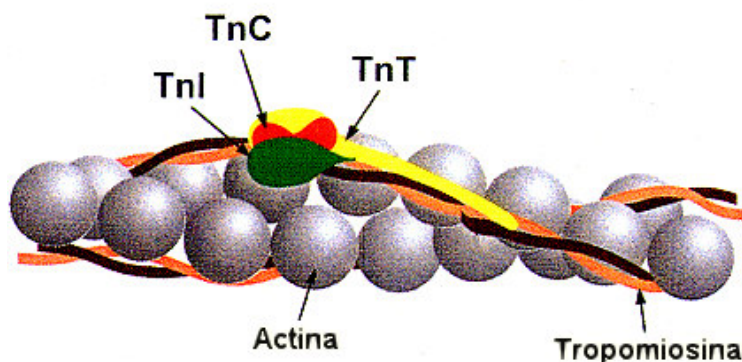
NOTA: As moléculas de actina G polimerizam-se, em condições fisiológicas, formando um longo filamento de actina F.

A tropomiosina (Tm) (Figura 6) é uma molécula longa e fina, com cerca de 40 nm de comprimento, formada por duas cadeias polipeptídicas (heterodímero), uma enrolada sobre a outra. Sua estabilidade é mantida por meio de interações hidrofóbicas entre resíduos de aminoácidos apolares, bem como por interações eletrostáticas entre resíduos de aminoácidos carregados (ZOT e POTTER, 1987). As moléculas dessa proteína unem-se umas as outras pelas extremidades para

formar filamentos que se localizam ao longo do sulco existente entre os dois filamentos de actina F e essa localização bem como as interações são importantes para a estabilização dos filamentos de actina F (PHILLIPS *et al.*, 1986). Diversos fatores influenciam a ligação da tropomiosina com a actina F, tais como, interações intrínsecas entre a tropomiosina e os monômeros de actina, interações entre regiões sobrepostas de moléculas de tropomiosina ao longo do filamento de actina e proteínas, tais como a troponina e miosina, que de forma expressiva aumentam na ligação da Tm com a actina F (GORDON *et al.*, 2000).

Associado a tropomiosina há um complexo protéico designado troponina que é constituído de três subunidades (Figura 6). Uma que apresenta sítios para ligação do íon cálcio, a troponina C (TnC), outra que encontra-se ligada a tropomiosina sendo chamada de troponina T (TnT) e a terceira que por ser capaz de inibir a interação da actina à miosina é designada de troponina I (TnI) (LEAVIS E GERGELY, 1984).

FIGURA 6 - ARRANJO MOLECULAR DA TROPONINA (Tn), TROPOMIOSINA (Tm) E ACTINA EM FILAMENTOS FINOS DE FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS ESQUELÉTICAS.



FONTE: GORDON, A. M; H. Regulation of Contraction in Striated Muscle. **Physiological Reviews**, vol. 80, n.2, p. 856, April. 2000.

NOTA: As três subunidades do complexo troponina estão indicadas por TnI, TnC e TnT.

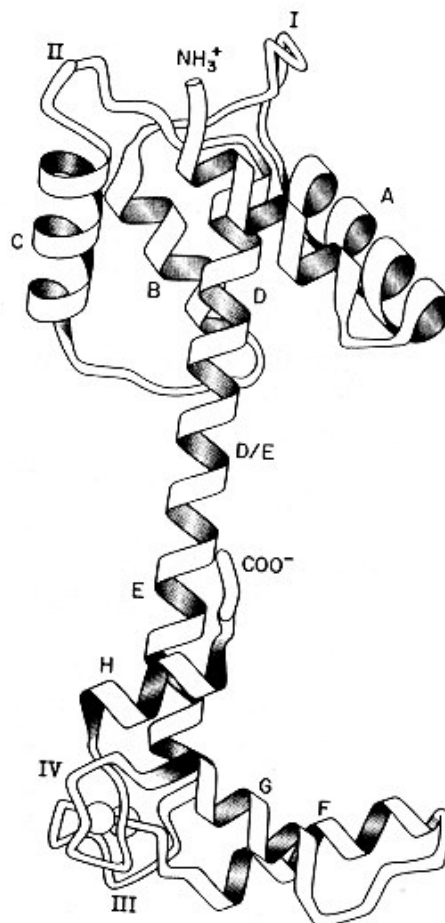
A molécula de troponina I, apresenta massa molecular situada entre 21-24 kDa e está envolvida na inibição da interação da actina com a miosina (STROMER, 1992), ou seja, essa proteína inibe a atividade ATPásica do complexo actomiosina. Esta subunidade do complexo troponina é de fundamental importância na manutenção da estrutura desse complexo pois, a troponina I liga-se a troponina C e a troponina T, além de ligar-se a actina, através de interações complexas e muitas vezes sendo reguladas pelo íon cálcio (GRABAREK *et al.*, 1981).

A molécula de troponina T consiste de 259 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular de 30 kDa (PEARLSTONE *et al.*, 1976). Essa proteína é altamente polar, com uma seqüência de resíduos (aminoácidos) ácidos próximos da região amino-terminal (resíduos 1-39) e uma predominância de resíduos básicos próximos da porção carboxi-terminal (resíduos 221-259) (ZOT e POTTER, 1992). A região amino-terminal interage com a tropomiosina e o porção carboxi-terminal, que possui aspecto globular, interage com TnC, TnI e Tm (GORDON *et al.*, 2000). Estudos utilizando troponina T recombinante (MALNIC *et al.*, 1998), demonstraram que a região amino-terminal da troponina T ativa o complexo actomiosina – ATPase na presença de tropomiosina, enquanto a interação do domínio globular da troponina T com o filamento fino bloqueia a atividade ATPásica na ausência de íons cálcio. Além disso, a região carboxy-terminal do domínio globular ancora o complexo binário TnC.TnI à troponina T, sendo essa interação independente de íons cálcio e ocorrendo com a região amino-terminal da molécula de troponina I.

Funcionalmente, essa proteína é fundamental na manutenção do complexo Tn-Tm-actina. Contudo, sua atividade não se restringe apenas na ligação da TnC-TnI com o complexo Tm-actina, mas também na ativação cooperativa dos filamentos finos. (GORDON *et al.*, 2000). Segundo GORDON *et al.* (2000), a interação da troponina T com o complexo TnC-TnI-Tm aumenta a inibição da atividade ATPásica do complexo actomiosina em condições onde ocorra ausência de íons cálcio, ao passo que na presença desse cátion observa-se aumento dessa atividade.

A troponina C (Figura 7) é formada por 159 resíduos de aminoácidos tendo massa molecular calculada de 18 kDa.

FIGURA 7- DIAGRAMA ESQUEMÁTICO REPRESENTANDO A MOLÉCULA DE TROPONINA C.



FONTE: RÜEGG, J.C. Troponin, the On-Off Switch of Muscle Contraction in Striated Muscle. In:____. **Calcium in Muscle Activation**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 85.

NOTA: Os dois sítios de alta afinidade ao íon cálcio encontram-se nos domínios III e IV na porção carboxi-terminal e os sítios de baixa afinidade estão presentes nos domínios I e II localizados na região amino-terminal da molécula. A existência de dois domínios globulares separados por uma longa α hélice faz com que a molécula de troponina C assumo o aspecto de um haltere.

A molécula de TnC apresenta duas regiões globulares, uma NH₂ terminal e outra COOH- terminal, conectadas por uma longa hélice central. Cada região contém dois sítios de ligação para os íons cálcio, e cada local de ligação ao Ca²⁺ consiste de um motivo estrutural hélice-alça-hélice, chamado dedos EF (POTTER e GERGELY, 1979; NELSON e COX, 2000). Há dois sítios com alta afinidade para o íon cálcio ($\sim 10^{-7}$ M) e com relativa afinidade ao íons magnésio que situam-se na porção carboxi-terminal e ligam-se ao Ca²⁺ e Mg²⁺. Tais sítios são denominados de domínios III e IV e de acordo com GORDON e colaboradores (GORDON *et al.*, 2000), estes domínios podem ser designados de sítios estruturais, pois a ligação dos íons magnésio-cálcio à estes sítios, aumenta a interação entre Troponina C e Troponina I, bem como a ligação da troponina C ao filamento fino. Os sítios com baixa afinidade ao íon cálcio ($\sim 10^{-5}$ M), estão localizados na porção amino-terminal sendo designados de domínios I e II. Estes domínios são dotados de sítios específicos para os íons cálcio, ou seja, apresentam alta seletividade para o íon cálcio em relação ao íon magnésio (POTTER *et al.*, 1976; JOHNSON *et al.*, 1978; LEAVIS *et al.*, 1978; FRANCOIS *et al.*, 1995; SZCZESNA *et al.*, 1996).

A ligação dos íons cálcio aos sítios III e IV é suficientemente forte ($K_D = 0,1\mu\text{M}$), tanto que, presume-se que estes sítios permaneçam preenchidos em condições de repouso, quando a concentração intracelular de íons cálcio é de 10^{-8} M. Por outro lado, os sítios I e II, onde K_D é de aproximadamente $10\mu\text{M}$, apresentem-se vazios quando o músculo está em repouso (ZOT e POTTER, 1992; GARRETT e GRISHAN, 1995; SZCZESNA *et al.*, 1996). Havendo elevação mioplasmática do íon cálcio, para níveis de aproximadamente 10^{-5}M , esses sítios tornam-se saturados por esse cálcio. Como consequência, a tropomiosina assume uma posição no filamento fino, que permite que a porção S1 da meromiosina pesada se ligue a actina, resultando na geração de tensão e/ou encurtamento do sarcômero (CHALOVICH, 1992; COOKE, 1997).

A contração muscular ocorre por meio da interação cíclica entre os filamentos grossos contendo miosina (pontes transversas) e os filamentos finos

que possuem actina-F (HUXLEY, 1957). A utilização da técnica de microscopia eletrônica de transmissão permitiu demonstrar que o encurtamento do sarcômero não é acompanhado pelo encurtamento dos filamentos contráteis e que a interação cíclica das pontes transversas da miosina, presentes na região de sobreposição dos filamentos grossos com os filamentos finos, provoca o deslizamento da actina sobre a miosina (HUXLEY, 1957; HUXLEY e HANSON, 1954; HUXLEY, 1980). A energia necessária para o desenvolvimento de tensão e ou encurtamento é oriunda da atividade ATPásica da cabeça da miosina (HIBBERT e TRENTAN, 1986; MOSS e HOFMANN, 1992; COOKE, 1997), quando em presença da actina, formando o complexo actina-miosina-ATP (GOLDMAN e BRENNER, 1987).

Durante a interação cíclica, segundo o modelo proposto por Huxley e outros pesquisadores (HUXLEY e NEIDERGERKE, 1954; HUXLEY e HANSON, 1954; HUXLEY, 1957), haveria um estado no qual a molécula de actina encontrar-se-ia desligada da cabeça da miosina, que não produziria força, e um outro estado onde o complexo formado pela actina e miosina (actina-miosina) estaria fortemente ligado sendo responsável pela geração de força. Contudo, estudos bioquímicos e de mecânica de contração, realizados posteriormente, sugerem que a interação da actina com a miosina e a conseqüente transdução de energia química em mecânica ocorreria em diferentes etapas. Segundo o modelo proposto por Goldmann e Brenner (GOLDMAN e BRENNER, 1987), haveria um estado em que a actina estaria fracamente ligada a miosina sendo incapaz de desenvolver força e um outro estado de forte ligação, responsável pelo desenvolvimento de força. De acordo com esse modelo existiria dois grupos de pontes transversas (fraca e forte ligação) cinética e estruturalmente diferentes e a produção de força seria resultado da interação cíclica entre actina e miosina a qual ocorreria em múltiplas etapas.

O fenômeno de interação das pontes transversas da miosina com a actina é regulado pela presença das proteínas do sistema regulatório tropomiosina-troponina (EBASHI, 1980; SALEH *et al.*, 1986; RÜEGG, 1988). Contudo, há controvérsia quanto ao mecanismo de regulação da interação cíclica dos

filamentos grossos e finos, pois mais de um modelo tem sido proposto para o fenômeno de regulação (CHALOVICH, 2002).

De acordo com o modelo de bloqueio estérico (Figura 8), que se fundamentou em estudos de difração de raios-X de músculos intactos, em conjunto com estudos de reconstituição tridimensional utilizando imagens de microscopia eletrônica de transmissão, realizados na década de 1970 (EL-SALEH *et al.*, 1986), a molécula de tropomiosina em condições de ausência de íons cálcio (concentração inferior a 10^{-7}M), assumiria uma posição no “sulco” do filamento fino que fisicamente bloquearia a ligação da miosina à actina, inibindo a actomiosina-ATPase (LEHMAN *et al.*, 1995). Em condições de estimulação (elétrica ou química), haveria liberação de íons Ca^{2+} , a partir dos estoques intracelulares, promovendo aumento da concentração mioplasmática desse íon (de 10^{-7}M para 10^{-5}M) (EL-SALEH *et al.*, 1986). A combinação dos íons cálcio com os sítios de baixa afinidade encontrados na molécula de troponina C induziria uma série de modificações de todo o complexo tropomiosina-troponina permitindo a interação da cabeça da miosina (S1) com a actina e conseqüentemente o desenvolvimento de força (LEHMAN *et al.*, 1994).

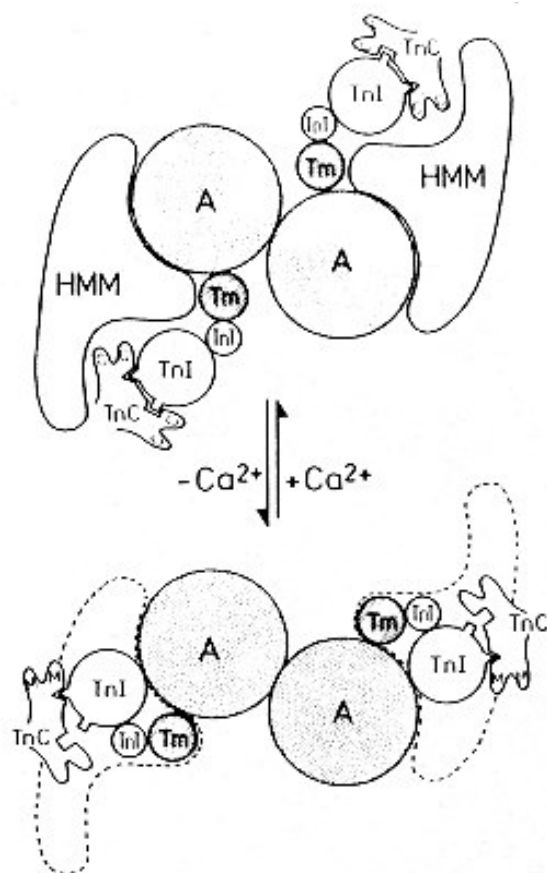
Pelo modelo alostérico/cooperativo a tropomiosina alteraria a conformação da actina de forma alostérica, ou seja, a tropomiosina não inibiria a ligação da actina com a cabeça da miosina no estado de fraca ligação, mas a isomerização do estado de fraca para forte ligação, e o íon cálcio seria o fator modulador da cinética de transição do estado de fraca para forte ligação (GOLDMANN e BRENNER, 1987).

De acordo com o modelo proposto por Lehrer (LEHRER, 1994), haveria combinação do modelo estérico com o alostérico/cooperativo, ou seja, os íons cálcio ligar-se-iam a molécula de troponina C provocando alteração conformacional do complexo tropomiosina-troponina, e isso, por sua vez, alteraria o efeito inibitório de isomerização do estado de fraca para forte ligação, exercido pela tropomiosina.

Devido a existência de mais de um modelo para explicar a regulação da contração preditos por diferentes investigadores sob diferentes condições

experimentais, Chalovich (CHALOVICH, 2002), sugere em recente revisão, que há necessidade do estabelecimento de critérios uniformes para que se efetue comparação mais eficiente dos diversos modelos.

FIGURA 8 - MODELO DO BLOQUEIO ESTÉRICO.



FONTE : RÜEGG, J.C. Troponin, the on-off Switch of Muscle Contraction in Striated Muscle. In:____. **Calcium in Muscle Activation**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 91. NOTA: Modelo de regulação da contração em fibras musculares esqueléticas, mostrando as alterações que são postuladas quando o íon cálcio liga-se a troponina C. Nesta figura A representa a actina, Tm a tropomiosina, TnC a troponina C, TnI a troponina I, TnT a troponina T e HMM a meromiosina de cadeia pesada.

1.3 Acoplamento Excitação-Contração (AEC)

Em músculo estriado esquelético, o mecanismo de acoplamento excitação-contração é definido como o processo pelo qual eventos elétricos presentes na superfície celular desencadeiam a liberação de íons cálcio existentes em estruturas intracelulares (BRUM *et al.*, 1987; ASHLEY, 1991; RIOS *et al.*, 1991).

Nesse processo, a onda de despolarização que se propaga ao longo do sarcolema, bem como através de invaginações dessa membrana, designadas túbulos transversos ou túbulos T (CASWELL *et al.*, 1976; IKEMOTO *et al.*, 1985), promove alterações conformacionais em proteínas específicas denominadas receptores diidropiridínicos ou canais lentos de cálcio (RIOS *et al.*, 1991; RIOS e PIZARRO, 1991; SHOSHAN-BARMATZ e ASHLEY, 1993), que atuam como sensores de voltagem. Esses receptores são os responsáveis pelo primeiro passo no mecanismo de AEC, pois a transdução do sinal desencadeia alterações nos receptores rianodínicos, localizados na membrana do retículo sarcoplasmático que atuam como canais vazantes de íons cálcio (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997). Com isso, há alteração da condução desses canais o que promove aumento da concentração intracelular desse íon levando, em última instância, a ativação das proteínas responsáveis pela contração muscular (EBASHI, 1991; KLEIN *et al.*, 1999).

Admite-se, também, que em músculo esquelético, a ativação do sistema contrátil não depende diretamente do influxo de íons cálcio do meio extracelular, algo que é observado em músculo de invertebrados, bem como em músculo cardíaco (FABIATO, 1985; NABAUER, *et al.*, 1989). Em músculo esquelético a principal fonte desse íon para a ativação das proteínas do sistema contrátil seria o retículo sarcoplasmático (ASHLEY *et al.*, 1991).

Esse sistema intracelular de membranas desempenha importante função na homeostasia do íon Ca^{2+} , uma vez que é dotado de proteínas que controlam a liberação desse cátion, bem como sua recaptação e armazenagem (MACLENNAN *et al.*, 1997; STOKES e WAGENKNECHT, 2000).

Os receptores diidropiridínicos (RDHP) são membros de uma família de canais iônicos dependentes de voltagem que incluem outros canais como os de Na^+ , Ca^{2+} e K^+ (HILLE, 1992; LEONG e MACLENANN, 1998; SORRENTINO *et al.*, 2000) e como descrito anteriormente os DHP, no músculo esquelético, atuam como sensores de voltagem no mecanismo de AEC em músculo esquelético.

Em músculo cardíaco, os RDHP são responsáveis pelo influxo de íons cálcio, durante os eventos que antecedem a ativação do sistema contrátil (KATZ, 1996; BERS, 2000; SCOOTE e WILLIAMS, 2002).

A utilização da técnica de microscopia eletrônica em condições de fratura à frio (freeze-fracture), permitiu evidenciar que em músculo esquelético, tais receptores estão agrupados em tétrades. As tétrades estão localizadas nos túbulos transversos, mantendo íntimo contato com a membrana da cisterna terminal do retículo sarcoplasmático, onde estão localizados, em alta densidade, os receptores rianodínicos (PROTASI *et al.*, 1998; FRANZINI-ARMSTRONG, 1999).

Evidências da participação dos receptores DHP como sensores de voltagem no mecanismo de AEC em músculo esquelético são oriundas de estudos nos quais se empregaram fármacos, tais como diidropiridinas e fenilalquilaminas, os quais promoviam bloqueio do movimento de cargas intramembrana, evento de suma importância durante a transdução do sinal elétrico para ativação da liberação de íons cálcio do RS (RIOS e BRUM, 1987; SCHNEIDER, 1994).

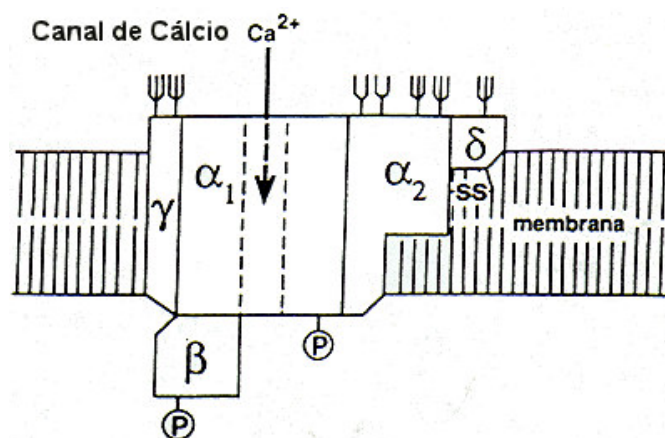
Estudos utilizando camundongos disgênicos, ou seja, animais que devido a um erro genético não determinam a expressão da subunidade $\alpha 1$ dos receptores RDHP (ver adiante), representaram, também, uma importante ferramenta para o estabelecimento da relação entre esses receptores e o mecanismo de AEC (FRANZINI-ARMSTRONG e JORGENSEN, 1994).

Nessa mesma direção, estudos realizados por Adams e colaboradores (ADAMS *et al.*, 1990), foram de suma importância, pois permitiram o restabelecimento do movimento de cargas em músculo de camundongos disgênico, quando se efetuou a infecção desses animais utilizando-se DNA complementar, responsável pela codificação dos receptores RDHP.

Outros estudos nos quais foi mensurada a velocidade de decaimento da concentração intracelular de íons cálcio após repolarização do sarcolema na presença de baixas concentrações de diidropiridinas, também evidenciaram a atuação dos RDHP como sensores de voltagem (SUDA, 1995).

A utilização de técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), em associação com “immunoblotting” permitiu a purificação e caracterização das subunidades dos receptores DHPR (CURTIS e CATERRALL, 1984; SHARP *et al.*, 1987; FLORIO, 1992). Tais estudos evidenciaram que esses receptores são complexos protéicos heterooligoméricos constituídos por pelo menos quatro polipeptídios associados não covalentemente que são codificados por quatro genes separadamente (LEUNG *et al.*, 1987). Esses polipeptídios ou subunidades são denominados de α_1 , α_2 , β e γ (Figura 9).

FIGURA 9 – SUBUNIDADES DOS RECEPTORES DHP



FONTE : MELZER, W.; HERMANN-FRANK, A. LÜTTGAU, H. CH. The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1241, p. 97, 1995.

NOTA: Os receptores DHP são complexos heterooligoméricos constituídos de quatro subunidades protéicas : α_1 , α_2 , β e γ .

A subunidade $\alpha 1$ (Figura 10), com massa molecular de aproximadamente 170 kDa, é a porção dos receptores DHP formadora do poro do canal, responsável pelo influxo de íons Ca^{2+} , sensível aos derivados diidropiridínicos e que atua como sensor de voltagem (PETERSON e CATERRALL, 1995; FRANZI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; LEONG e MACLENNAN, 1998; AHERN *et al.*, 2001a; DULHUNTY *et al.*, 2002).

Três isoformas $\alpha 1$ foram identificadas em músculo esquelético e uma no músculo cardíaco, e alguns pesquisadores admitem que as diferenças observadas entre o mecanismo de AEC presente no músculo cardíaco e esquelético são determinadas pelo tipo de isoforma dos receptores DHPR existentes nessas células (LAMB, 2000).

A subunidade $\alpha 2\delta$ é formada por duas cadeias polipeptídicas, denominadas $\alpha 2$, com massa molecular de aproximadamente 143 kDa e δ , com massa molecular entre 25 e 27 kDa (De JONGH *et al.*, 1990). Essas duas subunidades estão unidas por meio de pontes de dissulfeto (WANG *et al.*, 2002). Diferentes estudos demonstram que a subunidade δ apresenta um único segmento transmembrana e acredita-se que atue ancorando a subunidade $\alpha 2$, que é altamente glicosilada, a bicamada lipídica (BRICKLEY *et al.*, 1995; GURNETT *et al.*, 1996).

O plot de hidropaticidade indica que a subunidade β é uma cadeia polipeptídica hidrofílica, ao passo que a subunidade γ é composta por quatro segmentos transmembrana (WANG *et al.*, 2002). A função desses polipeptídeos auxiliares ($\alpha 2\delta$, β e δ), ainda não está totalmente esclarecida, apesar de diversos estudos indicarem que a subunidade $\alpha 2$ auxilia na expressão funcional de $\alpha 1$, a subunidade β colabore para a cinética apropriada dos canais de cálcio presentes em músculo esquelético e que δ seja um fragmento de $\alpha 2$ (FRANZINI-ARMSTRONG e JORGENSEN, 1994).

Outros estudos descrevem que a associação da subunidade β com $\alpha 1$ aumenta a eficiência do acoplamento entre a percepção da alteração de voltagem e a abertura do canal, bem como o aumento substancial na amplitude de corrente

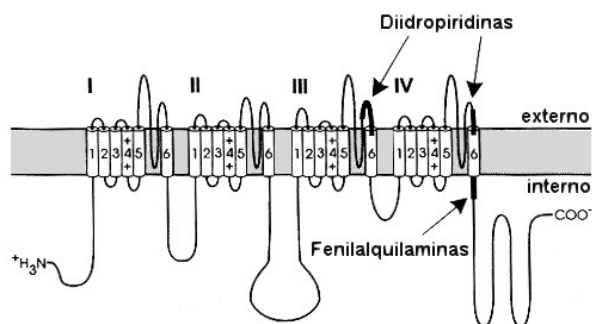
e a ausência da primeira altera a expressão da subunidade $\alpha 1$ (GREGG *et al.*, 1996).

Também foi mostrado que a associação de $\alpha 2\delta$ com $\alpha 1\beta$ aumenta a amplitude de corrente e a velocidade de inativação desses canais (LEONG e MACLENNAN, 1998).

A subunidade $\alpha 1$ (Figura 10) , é a mais conhecida e a análise da seqüência de resíduos de aminoácidos prediz que há 24 segmentos transmembrana com disposição em α -hélice, ou seja, existe quatro domínios, designados por I, II, III e IV, sendo que cada um possui seis segmentos transmembrana, S1 a S6 (MIKAMI *et al.*, 1989; TANABE *et al.*, 1987; TANABE *et al.*, 1990; NAKAI *et al.*, 1998; LAMB, 2000; STANGE, *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002).

Diferentes estudos apontam que a quarta seqüência transmembrana , denominada S4, apresenta resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Arg e Lis) e que movimentos dessas seqüências em resposta a alteração de voltagem determinaria a abertura do canal (LEONG e MACLENNAN, 1998; BEZANILLA, 2000). Adicionalmente, vários estudos apontam para o fato de que essa porção da molécula é sensível a variação de voltagem (TANABE *et al.*, 1987; TANABE *et al.*, 1990; NAKAI *et al.*, 1998).

FIGURA 10- MODELO ESQUEMÁTICO DA SUBUNIDADE $\alpha 1$ DOS DHP.



FONTE: MELZER, W.; HERMANN-FRANK, A. LÜTTGAU, H. CH. The role of Ca^{+2} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1241, p. 97, 1995) NOTA: Neste esquema são mostrados os sítios de ligação para drogas do grupo das diidropiridinas e das fenilalquilaminas

Diversos estudos descrevem que em músculo esquelético a alça citoplasmática existente entre os domínios II-III da subunidade $\alpha 1$ é crítica para o mecanismo de acoplamento excitação-contração (TANABE *et al.*, 1990; LEONG e MACLENNAN, 1998; DULHUNTY *et al.*, 1999; ZHU *et al.*, 1999). Tal possibilidade foi avaliada por meio da utilização de miócitos (células musculares em cultura) isolados de camundongos disgênicos, ou seja, animais que por um defeito genético não expressam a subunidade $\alpha 1$ (BEAM *et al.* 1986).

Nos miócitos de animais disgênicos devido a não codificação da subunidade $\alpha 1$ verifica-se que há ausência de corrente lenta de Ca^{2+} , falha no AEC, inexistência de tétrades bem como falta do movimento de cargas (TANABE *et al.*, 1988). Tais aspectos são restituídos quando se efetua a infecção dessas células com DNA complementar, codificador da subunidade $\alpha 1$ (TANABE *et al.*, 1988; ADAMS, *et al.*, 1990; TAKEMURA *et al.*, 1994).

A utilização de quimeras cardíacas/esqueléticas em miócitos disgênicos comprovou que a alça II-III é crítica para o mecanismo AEC em músculo esquelético (TANABE *et al.*, 1990).

Em 1995, El-Hayek e colaboradores (El-HAYEK *et al.*, 1995), publicaram os resultados de seus estudos e sugeriram a divisão da alça II-III em quatro sub-regiões ou fragmentos designados de A, B, C e D.

Estudos realizados com os fragmentos A e C apontaram para existência de uma seqüência de resíduos de aminoácidos denominada C1 (resíduos 720-745), presente no fragmento C (720-765) que é essencial para o mecanismo de AEC. Foi mostrado também que a região A, contendo os resíduos de aminoácidos 671-690, está intimamente envolvida na interação proteína/proteína existente entre os receptores RDHP e RyR (AHERN *et al.*, 2001a; AHERN *et al.*, 2001b).

Outros estudos apontam para a possibilidade da alça III-IV apresentar um papel fundamental no mecanismo de acoplamento excitação-contração; visto que, a interação entre os receptores RyR1 e a alça III-IV dos receptores DHP poderia apresentar um papel de inativação na liberação de íons cálcio por meio dos receptores RyR (isoforma RyR1, ver adiante), durante a repolarização do sarcolema (LEONG e MACLENNAN, 1998).

Há também estudos que descrevem que a mutação na alça de ligação entre os domínios III-IV poderia estar relacionada com a síndrome da hipertermia maligna (MONNIER *et al.*, 1997; LEONG e MACLENANN, 1998), uma anormalidade do mecanismo de liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares em músculo esquelético.

Os receptores rianodínicos (RYR), pertencem a uma família de canais de cálcio que apresentam papel fundamental na regulação da concentração intracelular de íons cálcio (CORONADO *et al.*, 1994; FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; PROTASI *et al.*, 1998; STOKES e WAGENKNECHT, 2000; FILL e COPELLO; 2002).

A rianodina apresenta alta afinidade por esses receptores. Essa substância é um alcalóide neutro extraído de folhas e caule de uma espécie vegetal nativa de Trinidad, cientificamente denominada *Ryania speciosa* (PESSAH *et al.* 1985, 1986).

A primeira evidência da participação dos receptores rianodínicos no mecanismo de acoplamento excitação-contração foi demonstrada por JENDEN e FAIRHUST (JENDEN e FAIRHUST, 1969), que verificaram que o composto rianodina interferia nesse mecanismo.

Estudos posteriores descreveram que o alcalóide rianodina em baixas concentrações ($< 10 \mu\text{M}$), promove liberação de cálcio do RS e em altas concentrações determina bloqueio da liberação de íons cálcio do RS (MEISSNER. 1986). Adicionalmente, outros trabalhos demonstraram que a rianodina apresentava alta afinidade por um receptor localizado no retículo sarcoplasmático juncional (PESSAH *et al.*, 1985, 1986).

A utilização de técnicas de microscopia permitiu descrever que em células musculares estriadas os receptores rianodínicos estão localizados em alta densidade em um domínio especial da membrana do retículo sarcoplasmático, a face juncional da membrana, pertencente ao retículo sarcoplasmático juncional (SAITO *et al.*, 1988).

Dentro desse domínio, os receptores rianodínicos estão associados, diretamente ou indiretamente, com outros componentes estruturais do retículo

sarcoplasmático juncional, tais como a calsequestrina, triadina e junctina, com as quais pode interagir funcionalmente (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI 1997; FRANZINI-ARMSTRONG e JORGENSEN 1994).

A face juncional da membrana do retículo sarcoplasmático está intimamente relacionada e forma junções com a superfície externa da célula (sarcolema e túbulos T). As junções entre a membrana do retículo sarcoplasmático e as membranas externas permitem interações entre os receptores rianodínicos e proteínas de superfície, os receptores diidropiridínicos (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI 1997).

A utilização de técnicas de isolamento do retículo sarcoplasmático, tais como centrifugação de homogeneizado de células musculares associadas com solubilização com detergentes não iônicos (CHAPS, por exemplo), permitiram a purificação dos receptores RYR que posteriormente foram incorporados em bicamadas lipídicas e reconstituídos em lipossomos, o que possibilitou uma avaliação minuciosa do comportamento desses receptores (SMITH *et al.*, 1986; INUI *et al.*, 1987; CAMPBELL *et al.*, 1987; LAI *et al.*, 1988; HYMEL *et al.*, 1988).

Moléculas intactas dos receptores rianodínicos foram primeiramente isoladas e purificadas em músculo estriado esquelético e músculo cardíaco de mamíferos. (IMAGAWA *et al.*, 1987; INUI *et al.*, 1987a, 1987b; LAI *et al.*, 1987; INUI *et al.*, 1988 ; LAI *et al.*, 1988; ANDERSON *et al.*, 1989).

Posteriormente, tais receptores foram encontrados no músculo liso e atualmente sabe-se que os receptores rianodínicos são amplamente distribuídos em um grande número de células não-musculares (HERRMANN-FRANK *et al.*, 1991; MARKS *et al.*, 1992) como , por exemplo, no cérebro de mamíferos (MURAYMA e OGAWA, 1996), cerebelo de galinhas (OUYANG *et al.*, 1997) e em linfócitos (GUSE *et al.*, 1999).

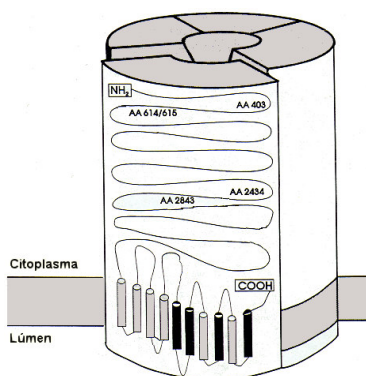
Diferentes estudos contribuíram para a descrição da estrutura primária dos receptores RYR bem como para a topologia da seqüência de aminoácidos com sua disposição na bicamada lipídica da membrana do RS e o posicionamento das regiões carboxi e amino terminal da cadeia polipeptídica (MARKS *et al.*, 1989;

TAKESHIMA *et al.*, 1989; NAKAI *et al.*, 1990; OTSU *et al.*, 1990; ZORZATO *et al.*, 1990; HAKAMATA *et al.*, 1992).

O aprimoramento das técnicas de obtenção de imagens por meio da utilização de microscopia confocal e microscopia crioelétrica tem permitido, uma visão mais aprimorada da liberação de íons cálcio bem como a reconstituição tridimensional dos receptores RYR e nesse último caso uma visão mais acurada dos sítios de ligação para diversos ligantes endógenos que estão associados a esses receptores (STOKES e WAGENKNECHT, 2000; DULHUNTY *et al.*, 2002; FIIL e COPELLO, 2002).

Os receptores RyR (Figura 11), são homotetrâmeros com massa molecular de aproximadamente 560 kDa. Estudos utilizando imagens oriundas de técnicas de microscopia eletrônica evidenciam que os receptores RYR apresentam dimensões de 29 X 29 X 12nm com quatro subunidades que assumem aspecto de um trevo de quatro folhas (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997),

FIGURA 11- ESTRUTURA DOS RECEPTORES RyR



FONTE: MELZER, W.; HERMANN-FRANK, A. LÜTTGAU, H. CH. The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1241, p. 100, 1995.

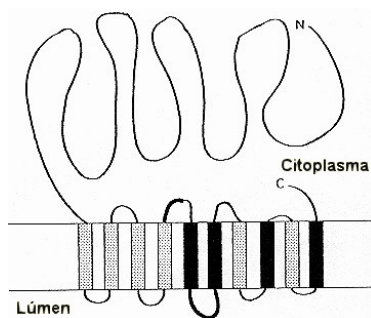
NOTA: Os segmentos hidrofóbicos estão localizados na membrana e os segmentos hidrofílicos formam um grande domínio citoplasmático.

Os segmentos hidrofóbicos (ver adiante), das quatro subunidades, aparentemente idênticas, formam a base que está localizada na membrana e os segmentos hidrofílicos formam um grande domínio citoplasmático que “ornamenta” a base central (SHOSHAN-BARMATZ e ASHLEY, 1998). De acordo com outros estudos de microscopia eletrônica (WAGERKNECHT *et al.*, 1997), aproximadamente 80% da massa total do receptor forma a porção citoplasmática, e os 20% restantes projetam-se como uma base central e provavelmente formam a porção transmembrana do receptor.

Análises tridimensionais descrevem que há um poro comum, localizado na base central, com quatro canais que se estendem radialmente, e cada um desses canais abre-se em um vestíbulo periférico. De acordo com alguns pesquisadores, após a abertura do canal central, os íons cálcio movem-se através dos canais radiais e por meio das cavidades laterais são liberados no mioplasma (RADERMACHER *et al.*, 1994; SHOSHAN-BARMATZ e ASHLEY, 1998).

A análise de “plots” de hidropaticidade indica que os receptores RyRs apresentam uma grande região hidrofílica NH₂-terminal e uma pequena porção COOH-terminal (Figura 12) (MEISSNER, 1994).

FIGURA 12 - MODELO ESQUEMÁTICO DOS RECEPTORES RIANODÍNICOS



FONTE: MEISSNER, G. Ryanodine Receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. **Annu. Rev. Physiol.**, n. 56, p.491, 1994.

NOTA: Neste modelo a porção transmembrana é constituída por 10 segmentos hidrofóbicos e a porção hidrofílica da molécula forma um grande domínio citoplasmático.

A região hidrofílica NH₂-terminal constitui a porção citoplasmática da molécula ou “pé”, parecendo ser o ponto de acoplamento mecânico com os receptores DHP. A pequena porção COOH-terminal, hidrofóbica, é responsável pela formação do canal intramembrana (MEISSNER, 1994; FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997).

Apesar de existir um certo consenso em relação a estrutura geral da molécula, afirmando-se que o domínio citoplasmático dos canais é altamente simétrico e que cada um dos polipeptídios contribui com um quarto na formação do complexo total (MARKS, 1997), há discordância quanto ao número de segmentos existentes na bicamada lipídica. Neste contexto, existem dois modelos mais aceitos, o primeiro que prediz a presença de 4 domínios transmembrana situados próximos a porção COOH-terminal (TAKESHIMA *et al.*, 1989), cuja alça luminal M3-M4 estaria relacionada com a formação do poro do canal (GAO *et al.*, 2000) e o segundo (TREVES *et al.*, 1993; ZORZATO *et al.*, 1990) que afirma a existência de 10 segmentos transmembrana (Figura 12).

Diversos estudos descrevem a existência de três isoformas denominadas RyR1, RyR2 e RyR3 que são codificadas por três genes distintos e encontradas em diferentes tecidos (CORONADO *et al.*, 1994; LEONG e MACLENNAN, 1998).

A isoforma RyR1 é também denominada isoforma esquelética, pois foi primariamente identificada e completamente seqüenciada a partir de células musculares estriadas esqueléticas. Nesse tecido somente essa isoforma é capaz de interagir com a subunidade $\alpha 1$ dos receptores DHPR sendo esse evento de fundamental importância para o mecanismo de AEC (FELDER e FRANZINI-ARMSTRONG, 2002).

Vale ressaltar que a isoforma RYR1 não é exclusivamente observada em fibras musculares esqueléticas, pois alguns estudos demonstraram a existência da isoforma RyR1 no cérebro (células de Purkinje do *cerebellum*), bem como em algumas células musculares lisas (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997).

Por meio de estudos utilizando técnicas de biologia molecular foi possível descrever o cDNA responsável pela codificação da isoforma tipo 1 presente no

músculo estriado esquelético de mamíferos (incluindo seres humanos) (TAKESHIMA *et al.*, 1989; ZORZATO *et al.*, 1990). Estes estudos foram de suma importância para a demonstração que essa isoforma consiste de 5.032 ou 5.037 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular com valor situado entre 563 e 565 kDa (CORONADO *et al.*, 1994).

A isoforma RyR2 é predominante no tecido cardíaco, sendo também encontrada em outros tecidos tais como tecido nervoso, e em menor quantidade, no tecido muscular liso (NEYLON *et al.*, 1995; FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997).

No tecido cardíaco acredita-se que essa isoforma seja responsável pela liberação dos íons cálcio a partir do retículo sarcoplasmático em resposta ao íon cálcio que penetra via canais lentos de cálcio (L-type or receptores DHP), em um processo designado de liberação de cálcio induzida pelo cálcio (LAMB, 2000).

A utilização de estudos com DNA complementar demonstraram que a isoforma RyR2 presente no tecido cardíaco de coelho, apresenta 4.969 ou 4.968 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 564.711 ou 565.067 ou 565.901 kDa (NAKAI *et al.*, 1990; OTSU *et al.*, 1990). Por meio de estudos comparativos foi possível demonstrar que essa isoforma apresenta 66% de homologia quando comparada com a RyR1 (CORONADO *et al.*, 1994; FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997).

A Isoforma RyR3 é encontrada no encéfalo, preferencialmente no hipocampo e estriado e está presente em menor quantidade em outros tecidos, tais como muscular esquelético e liso, bem como em células não-excitáveis tais como linfócitos, mas é ausente no tecido cardíaco (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; JEYAKUMAR *et al.*, 1998; PROTASI *et al.*, 2000; FELDER e FRANZINI-ARMSTRONG, 2002; FILL e COPELO, 2002).

Estudos utilizando DNA complementar demonstraram que o receptor rianodínico cerebral é constituído de 4.872 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 551.901 kDa, apresentando aproximadamente 70% de homologia em sua seqüência de aminoácidos em relação as isoformas cardíaca e esquelética (CORONADO *et al.*, 1994).

Os receptores RyR3 são particularmente abundantes em células musculares esqueléticas de algumas espécies de vertebrados não-mamíferos (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997).

Em músculo esquelético de mamíferos a expressão da isoforma RyR3 é altamente variável entre diferentes grupos de músculos (CONTI *et al.*, 1996; JEYAKUMAR *et al.*, 1998). Por exemplo, o receptor RyR3 é amplamente expresso no diafragma (SONNLEITER *et al.*, 1998; PROTASI *et al.*, 2000) de várias espécies de mamíferos, mas escassamente em alguns outros músculos (SHOSHAN-BARMATZ e ASHLEY, 1998).

Outros estudos sugerem que essa isoforma apresenta uma contribuição qualitativa no mecanismo de AEC de músculo esquelético (SORRENTINO *et al.*, 2000), uma vez que animais geneticamente alterados, ou seja, que apresentaram remoção do gene responsável pela expressão dessa isoforma (knockout) são viáveis na vida adulta e exibem o mecanismo de AEC (TAKESHIMA *et al.*, 1996; DIETZE *et al.* 1998). Por outro lado, camundongos geneticamente modificados, com relação a expressão dessa isoforma no tecido nervoso, apresentam alterações da plasticidade sináptica hipocámpal e problemas de aprendizado, indicando assim o envolvimento dessa isoforma na fisiologia do Sistema Nervoso Central (FUTATSUGI *et al.*, 1999)

Em músculos esqueléticos de vertebrados não mamíferos tais como aves, anfíbios, répteis e peixes existem duas isoformas que inicialmente foram denominadas de α e β (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; JEYAKUMAR *et al.*, 1998; SORRENTINO *et al.*, 2000).

As isoformas α e β foram identificadas como receptores rianodínicos com base: a) em suas massas moleculares; b) em sua existência como grandes homoligômeros; c) na existência de ligação com rianodina [^3H]; d) em sua habilidade em formar canais liberadores de íons cálcio (AIREY *et al.*, 1990; OLIVARES *et al.*, 1991 ; LAI *et al.*, 1992; MURAYMA e OGAWA, 1992).

Estudos moleculares descreveram que a isoforma β presente no músculo esquelético de galinhas e rãs é reconhecida, atualmente, como a isoforma RyR3, enquanto a isoforma α é homologa à isoforma RyR1. A utilização de músculo

esquelético de anfíbios permitiu demonstrar que a isoforma α apresenta 80% de similaridade quando comparada com a isoforma RyR1 presente no músculo esquelético de coelho, enquanto a isoforma β apresenta cerca de 85%-86% de similaridade em relação a isoforma RyR3, encontrada no cérebro de coelho. Esses estudos também descreveram que essas duas isoformas divergem consideravelmente da isoforma RyR2 (OYAMADA *et al.* 1994; OGAWA e MURAYMA, 1995).

Essas isoformas podem coexistir na mesma fibra e foi sugerido que o sinal de despolarização presente na membrana do túbulo transverso é captado pelo sensor de voltagem (Receptor DHP), sendo transmitido diretamente para a isoforma α que determina a liberação de íons cálcio (despolarização induz liberação de íons cálcio), que então induz liberação adicional de íons cálcio através da isoforma β , a qual operaria como um canal liberador de cálcio induzido pelo cálcio (mecanismo este, conhecido por liberação de cálcio induzida por cálcio (OBA, 1997).

A presença dos receptores rianodínicos não é restrita aos vertebrados, pois diversos estudos demonstraram que as membranas do retículo sarcoplasmático de músculos de invertebrados apresentam canais liberados de cálcio (RyR) que são estruturalmente similares aos receptores rianodínicos presentes em músculo estriado esquelético de vertebrados (QUINN *et al.*, 1998; SORRENTINO *et al.*, 2000; FILL e COPELLO, 2002).

Os receptores rianodínicos são modulados por efetores endógenos, tais como Ca^{2+} , ATP, Mg^{2+} , bem como por meio de fosforilação e oxidação. Diversos agentes externos tais como cafeína, rianodina, vermelho de rutênio, dantrolene entre outros também modulam a atividade desses receptores. Há diversas proteínas que se encontram intimamente associadas aos receptores RyR, incluindo calmodulina, calsequestrina, triadina e FK506. Essas interações são importantes na regulação e na otimização da função de liberação de íons cálcio desempenhada pelos receptores rianodínicos (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; PROTASI *et al.*, 2000; FRANZINI-ARMSTRONG; DULHUNTY *et al.*, 2002; FILL e COPELLO, 2002).

1.4 Teorias do Mecanismo de Acoplamento Excitação-Contração

Embora exista um amplo conhecimento da estrutura dos receptores diidropirídínicos bem como dos rianodínicos, o mecanismo de acoplamento excitação-contração não se encontra completamente esclarecido e ao longo de mais de duas décadas de estudos, diferentes hipóteses foram para explicar tal fenômeno (RIOS e PIZARRO; 1991). Tais hipóteses foram: 1) transmissão elétrica por meio de uma via iônica do túbulo T para o retículo sarcoplasmático ou por um efeito direto do campo elétrico transmembrana sobre os pés dos receptores rianodínicos (MATHIAS *et al.*, 1980) ; 2) alcalinização próxima ao canal de liberação (SHOSHAN *et al.*, 1981) ; 3) oxidação do grupo sulfidril na proteína de canal (TRIMM *et al.*, 1986) ; 4) liberação de cálcio induzida pelo cálcio (FABIATO, 1983); 5) transmissão por meio do trifosfato de inositol (InsP₃) (VERGARA *et al.*, 1985; VOLPE *et al.*, 1985); 6) acoplamento eletromecânico (CHANDLER *et al.*, 1976). Para uma maior compreensão analisaremos cada uma dessas hipóteses separadamente.

O mecanismo de transmissão elétrica (MATHIAS *et al.*, 1980), propõe que haveria transmissão elétrica através de um canal iônico localizado no lúmen do túbulo transverso e retículo sarcoplasmático ou por efeito direto no receptor RyR, localizado na membrana do RS, admitindo-se que o potencial de membrana propagado pela membrana do túbulo T seria transmitido ao RS determinando geração de um potencial de ação na membrana desse compartimento. Contudo, essa hipótese foi descartada, pois a membrana do retículo sarcoplasmático é altamente permeável, impossibilitando o surgimento de um gradiente eletroquímico (MEISSNER, 1983). De forma complementar, nenhuma gradiente iônico, exceto do íon cálcio, têm sido observado, através das membranas do RS. Diante disso, é pouco provável que esse mecanismo venha operar no desencadeamento da liberação de íons cálcio do RS (RIOS e PIZARRO, 1991).

A hipótese de alcalinização foi proposta com um mecanismo de transmissão, pois estudos realizados por Shoshan e colaboradores (SHOSHAN *et al.*, 1981) , demonstraram que o aumento do pH local, na ordem de 0,2 unidades,

determinava contração em fibras permeabilizadas. Por outro lado, o aumento na quantidade de prótons (acidificação) promovia bloqueio de canais incorporados em bicamadas (MA e CORONADO, 1988). Contudo, diversos motivos experimentais, tais como diferentes valores obtidos de alteração do pH intracelular por meio de mensuração óptica (BAYLOR *et al.*, 1982) e críticas quanto à interpretação desses resultados apontaram para a não aceitação dessa hipótese. Além disso, segundo Endo (ENDO, 1985), a quantidade de Mg^{2+} livre utilizada foi baixa e a própria manipulação experimental poderia, “per se” ter promovido a liberação de cálcio induzida pelo cálcio.

A oxidação de grupos sulfidríla foi proposta após experimentos que demonstraram que metais pesados e oxidantes sulfidríla determinavam liberação de íons cálcio do RS, a qual era cineticamente rápida e reversível (TRIMM *et al.*, 1986). Contudo, para que a oxidação de sulfidrílas passasse a ter importância fisiológica era necessário um aumento de oxidantes sulfidríla endógenos. Tal fato, entretanto não foi demonstrado. Adicionalmente estudos utilizando agentes redutores tais como ditioneitol e glutatona, que bloqueiam a liberação de cálcio induzido pela prata em RS fracionado, não promoveram bloqueio do transiente de íons cálcio induzido pela despolarização em fibras isoladas (BRUNDER *et al.*, 1988).

O mecanismo de liberação de cálcio induzida pelo cálcio (“calcium induced calcium release”), propõe que o íon cálcio entraria na célula por meio dos canais lentos de cálcio e atuaria como um mensageiro intracelular promovendo a liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares. Esse mecanismo é amplamente aceito em músculo estriado cardíaco (FABIATO, 1983; ENDO, 1985); entretanto, para músculo esquelético existem controvérsias. Vários estudos demonstram que, nesse tipo celular, há liberação de cálcio de forma independente da presença de cálcio no meio extracelular. Outros estudos descrevem que o influxo de íons cálcio através da membrana do túbulo transversal parece não ser necessário para a transmissão de sinal do túbulo T para o retículo sarcoplasmático (SCHNEIDER, 1994; SHIROKOVA e RIOS, 1996). Isto sugere que o mecanismo de liberação de cálcio induzida pelo cálcio não operaria em músculo esquelético.

Existem também evidências que apontam para a possibilidade desse mecanismo contribuir para a ativação do músculo esquelético, uma vez que, estudos experimentais demonstram ocorrência de liberação de íons cálcio induzida pelo cálcio em fibras esqueléticas permeabilizadas, bem como em preparações que utilizaram RS ou RyR isolados (ZUCCHI e RONCA-TESTONI, 1997). Além disso, estudos de morfologia descrevem que uma grande fração dos receptores RyR não está associada aos receptores DHPR (ver adiante) (FRANZINI-ARMSTRONG e JORGENSEN, 1994) e isso sugere que o mecanismo de liberação de cálcio induzida pelo cálcio seria importante para amplificação do sinal (ZUCCHI e RONCA-TESTONI, 1997; FILL e COPELLO, 2002).

A transmissão química via síntese de inositol trifosfato (InsP_3) foi amplamente debatida durante a década de 1980. Esse composto é responsável pela liberação de íons cálcio de estoques intracelulares de músculo liso e outros tipos celulares (HAROOTUNIAN *et al.*, 1991; PERES *et al.*, 1991; FINCH *et al.*, 1991; ZHANG *et al.*, 1993). Entretanto, o papel do InsP_3 em músculo esquelético e cardíaco é ainda controverso.

Estudos iniciais realizados por diferentes pesquisadores utilizando diversas preparações, tais como células isoladas e vesículas de RS, demonstram que esse mensageiro secundário promovia liberação de íons cálcio e contração muscular, levando vários pesquisadores a propor a participação desse composto no mecanismo de AEC (VERGARA *et al.*, 1985; VOLPE *et al.*, 1985; DONALSON, *et al.*, 1986).

Outros estudos demonstraram também a existência de toda maquinaria bioquímica essencial para o metabolismo do InsP_3 (SANCHEZ *et al.*, 1991), bem como a possibilidade de sua ligação no inositol trifosfato à porção pesada do RS indicando a presença de receptores InsP_3 nessa estrutura (ROJAS e HIDALGO, 1990). A existência desses receptores também ficou evidenciada em fibras esqueléticas de mamíferos (JAIMOVICH, 1991).

Entretanto, vários estudos evidenciaram que esse composto não seria relevante no mecanismo de AEC, pois a microinjeção de InsP_3 em fibras intactas não promoveu contração (WALKER *et al.*, 1987), além do que a liberação de

cálcio bem como a tensão desenvolvida foram mostradas ser geralmente menores que aquelas observadas em condições fisiológicas (RIOS e PIZARRO, 1991).

Adicionalmente por meio de cálculos específicos, demonstrou-se que a concentração de InsP_3 , no espaço existente entre o túbulo T e a membrana do SR, seria extremamente baixa quando comparada àquela necessária para determinar liberação de cálcio durante o desenvolvimento de tensão (RIOS e PIZARRO, 1991). Além disso, a liberação de íons cálcio e a tensão gerada induzida pelo InsP_3 estariam aquém de apresentarem importância fisiológica (JAIMOVICH, 1991).

Por outro lado, estudos recentes evidenciaram que em diferentes preparações de músculo esquelético, ocorreu liberação de cálcio promovida pela utilização de InsP_3 , bem como o bloqueio de tal evento por meio da heparina (LOPEZ E TERZIC, 1996; TALON *et al.*, 1997; CATINOT *et al.*, 1998; TALON *et al.*, 1999, TALON *et al.*, 2000; ESTRADA *et al.*, 2001; TALON *et al.*, 2002), sugerindo assim a existência de receptores InsP_3 nessa musculatura.

Por meio do estudo de co-localização da proteína denominada HOMER, que em neurônios encontra-se associada aos receptores InsP_3 , foi possível demonstrar que esses receptores estão presentes na fração longitudinal do RS, onde estão localizadas as bombas de cálcio dependente de ATP e Mg^{2+} . Desse modo sugeriu-se que os receptores InsP_3 poderiam estar associados com a regulação da recaptção de Ca^{2+} que ocorre nessa região do RS (SALANOVA *et al.*, 2002).

Outros trabalhos sugeriram que em músculo esquelético haveria aumento na produção de InsP_3 após ativação da subunidade $\alpha 1$ dos receptores RDHP, o que promoveria liberação de íons cálcio que não estaria relacionada ao evento de ativação do sistema contrátil, mas sim a ativação de uma cascata de eventos, o que, em última instância, determinaria a ativação de fatores de transcrição. Ou seja, eventos elétricos de membrana seriam, via DHPR, em associação com a síntese de InsP_3 , responsáveis pela gênese de uma corrente lenta de íons cálcio a partir do RS, que estaria relacionada com a regulação da expressão gênica. Estudos utilizando bloqueadores de canais lentos de íons cálcio, tais como

nifedipina, que evidenciaram inibição tanto da diferenciação quanto da expressão gênica em linhagens de células miogênicas (PORTER et al. 2002; ARAYA *et al.*, 2003), reforçam essa suposição

Assim, embora diferentes resultados demonstre, claramente, a existência de síntese de InsP3 bem como sua capacidade de liberação de íons cálcio do RS, mas sua participação como mensageiro secundário do mecanismo de AEC permanece controverso.

Dentre as diferentes hipóteses sugeridas para explicar o mecanismo de acoplamento excitação-contração, a que apresenta maior, devido a existência de diversas evidências experimentais, é aquela que sugere a existência do acoplamento mecânico entre os receptores RDHP e RyR, inicialmente proposta por Schneider e Chandler (SCHNEIDER e CHANDLER, 1973; CHANDLER *et al.*, 1976).

Diferentes estudos sugerem a existência de interação entre a alça citoplasmática II e III dos receptores RDHP com as projeções citoplasmáticas, designadas de pés, dos receptores RyR. E durante o AEC a onda de despolarização (potencial de ação) que percorreria o sarcolema e os túbulos transversos, induziria mudanças conformacionais no sensor de voltagem (DHPR), as quais podem ser mensuradas eletrofisiologicamente como uma corrente capacitiva não-linear, denominada de movimento de carga intramembrana (SCHNEIDER e CHANDLER, 1976; ADRIAN *et al.*, 1976). Esse evento determinaria ativação mecânica dos receptores RyR, promovendo então a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático.

Admite-se que esse mecanismo envolva um acoplamento instantâneo e que a mudança no fluxo de íons cálcio do RS ocorra tão rápido quanto o movimento de cargas intramembrana (RIO e PIZARRO, 1991).

Em termos estruturais descreve-se que há 4 receptores DHP reunidos em tétrades para cada receptor RyR, ou seja, cada uma das subunidades dos receptores RyR, ou cada vértice do “trevo de 4 folhas”, apresentaria um receptor DHPR, que estaria, como mencionado, acoplado mecanicamente (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997).

Entretanto, há RyR que não está acoplados. Sugeriu-se então que este seria ativado por meio dos íons cálcio liberados através dos receptores RyR acoplados mecanicamente. Entretanto, tal fato parece não ser provável, pois se verifica que os receptores RyR estão inibidos pelo Mg^{2+} em condições de repouso e essa inibição permanece, mesmo após o incremento da concentração de íons cálcio (MEISSNER, 1994).

Assim, sugeriu-se que o sinal do mecanismo de acoplamento excitação-contracção seria transmitido de forma coordenada e sincrônica dos RyR acoplados para os não acoplados e, nesse sentido, haveria necessidade da existência de proteínas que permitissem a interação entre os RyR. Recentemente, demonstrou-se a existência de uma proteína denominada FKPB que teria papel fundamental na coordenação e ligação simultânea do grupo de RyR, de forma cooperativa (BRILLANTES *et al.*, 1994; MARX *et al.*, 1998).

1.5 Substâncias utilizadas como ferramentas para o estudo do mecanismo Acoplamento Excitação-Contração

Diversos agentes farmacológicos são utilizados como ferramentas para promover perturbação do processo de AEC, auxiliando a desvendar os mecanismos intrínsecos envolvidos nesse processo.

As ferramentas mais utilizadas são: drogas do grupo das **diidropiridinas (nifedipina); cafeína (1,3,7 trimetilxantina), dantrolene, rianodina, vermelho de rutênio, anestésicos locais como a tetracaína e procaína; neomicina e heparina** (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; ZUCCHI e RONCA-TESTONI, 1997; SHOSHAN-BARMATZ e ASHLEY, 1998).

Esses compostos são empregados em diferentes preparações, com objetivo de atuarem nos canais lentos de Ca^{2+} , como ocorre com os derivados diidropiridínicos (FILL e BEST, 1989, COGNARD *et al.*, 1986) e também na inibição da liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, por meio de sua ação nos receptores rianodínicos, como é observado com os anestésicos locais, dantrolene, vermelho de rutênio, rianodina e neomicina (RONCA-TESTONI, 1997).

A cafeína representa uma importante ferramenta de estudos, pois promove mobilização de íons cálcio dos estoques intracelulares (HERMANN-FRANK, 2000). Ao passo, que a heparina, e o 2 aminoetoxidifenil-borato, atuam como antagonistas da mobilização de cálcio promovida pelo inositol 1,4,5 – trifosfato (InsP_3) (MARUYAMA *et al.*, 1997; TALON *et. al.*, 2002; BILMEN e MICHELANGELO, 2002).

Derivados diidropiridínicos são fármacos amplamente utilizados como agentes hipotensores e inibem o mecanismo de acoplamento excitação-contração em músculo liso vascular e em células do miocárdio, por atuarem como antagonistas dos canais lentos de cálcio (receptores diidropiridínicos-DHP) (WEIGL *et al.*, 2000).

Apesar dos efeitos dos derivados diidropiridínicos em canais lentos de cálcio sensíveis a voltagem estarem bem descritos na literatura e com aplicação terapêutica corrente (MELTZER *et al.*, 1995). Seus efeitos em músculo estriado esquelético não são completamente esclarecidos, pois estudos em diferentes preparações indicam que esses compostos podem ora estimular (KITAMURA *et al.*, 1994) ora inibir o mecanismo de acoplamento excitação-contração, por interferirem no movimento de cargas responsável pela ativação dos canais liberadores de cálcio do retículo sarcoplasmático (RIOS e BRUM, 1987; CAPUTO e BOLAÑOS, 1987; POSTERINO e LAMB, 1998; HUANG, 1990).

Estudos utilizando microinjeção de nifedipina (um derivado diidropiridínico) em células musculares de anfíbios evidenciaram que esse composto promove bloqueio da corrente de cálcio (McCLESKEY, 1985).

Por outro lado, estudos realizados com retículo sarcoplasmático isolado indicaram que a nifedipina apresenta um pequeno efeito liberador de íons cálcio quando empregada em alta concentração (PALADE, 1987).

A utilização de feixes de células permitiu demonstrar que a nifedipina reduz a contração induzida pela exposição do músculo ao potássio, em condições de baixa concentração de cálcio externo e presença de EGTA (DULHUNTY e GAGE, 1988).

Por meio da técnica de patch-clamp demonstrou-se o efeito de bloqueio da nifedipina no mecanismo de AEC de células musculares em cultura (COGNARD *et al.*, 1991).

Estudos adicionais descreveram que a nifedipina determinou redução do efeito inotrópico positivo promovido pela adrenalina sobre a contração induzida pelo potássio em células musculares de rãs (GARCIA e SÁNCHEZ, 1994). A nifedipina promoveu bloqueio da corrente lenta de cálcio em miócitos expostos à soluções contendo 47 mM de íon potássio (ARAYA *et al.*, 2003).

As evidências anteriores indicam que a nifedipina atua como um agente bloqueador dos receptores RDHP, apesar de alguns estudos indicarem que esse composto promove liberação de íons cálcio à partir da via sensível a rianodina (WEIGL *et al.*, 2000).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcalóide extraído de grãos do café e extensivamente utilizado como ferramenta nos estudos do mecanismo de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (ENDO, 1977; STEPHENSON, 1981; FABIATO, 1983; SORENSON *et al.*, 1986; MEISSNER e HENDERSON, 1987; PALADE, 1987).

Estudos realizados nas décadas de 1950 e 1960 demonstraram que a cafeína, em concentração relativamente alta (faixa de milimolar), determinava contração muscular sem alterar as características elétricas de membranas excitáveis. Adicionalmente, demonstrou-se que a cafeína promovia contração mesmo após prolongada despolarização das fibras musculares e que a liberação de cálcio induzida por esse composto era independente do influxo de íons cálcio do meio externo (AXELSON e THESLEFF, 1958; SANDOW, 1965; CAPUTO , 1966 ; LÜTGAU e OETLINKER, 1968).

Contudo, estudos recentes descrevem que a cafeína promove uma pequena mudança no movimento de cargas intramembrana, em potenciais mais negativos (SZÜCS *et al.*, 1991; SHIROKOVA e RÍOS, 1996). Em experimentos onde o retículo sarcoplasmático encontrava-se depletado de cálcio, sendo induzido subsequente a uma contração induzida pela cafeína, verificou-se que ocorreu aumento do movimento de cargas quando a cafeína era utilizada

antes da despolarização bem como durante a despolarização (RIOS e PIZARRO, 1991). Diante desses fatos, esses autores propuseram que o cálcio liberado pela cafeína interagiu diretamente com os sítios de ligação do sensor de voltagem (HERRMANN-FRANK *et al.*, 1999).

Outros estudos realizados na década de 1960 descreveram que a cafeína promovia liberação de cálcio de fragmentos isolados de retículo sarcoplasmático (RS), e que esse evento era bloqueado pela presença de procaína, um inibidor da liberação de cálcio do RS (WEBER e HERZ, 1968). Nesse mesmo experimento evidenciou-se que a fração pesada do retículo sarcoplasmático, oriunda da cisterna terminal, apresentava maior liberação de íons cálcio do que a fração leve proveniente da porção longitudinal. Atualmente, sabe-se que a fração pesada contém grande quantidade de receptores rianodínicos (MENSHIKOVA E RITOV, 1986; WYSKOVSKY, 1994).

Na década de 1970 os trabalhos realizados por Endo *et al.* (ENDO *et al.*, 1970) e Ford e Podolsky (FORD e PODOLSKY, 1970) demonstraram o fenômeno conhecido por liberação de cálcio induzida pelo cálcio e estudos utilizando fibras musculares permeabilizadas demonstraram que a cafeína potencializava esse fenômeno (ENDO, 1975), e dessa forma a cafeína tornou-se uma importante ferramenta para o estudo desse fenômeno (SHIROKOVA e RÍOS, 1996).

Estudos posteriores utilizando receptores rianodínicos incorporados em bicamada lipídica planar demonstraram que a cafeína promovia o aumento na probabilidade de abertura do canal e com isso maior liberação de íons cálcio (ROUSSEAU *et al.*, 1988).

Outras investigações demonstraram que o efeito da cafeína era modificado por dois ativadores fisiológicos, o cálcio e o ATP e o mecanismo de liberação de íons cálcio induzido pela cafeína era inibido pelo íon magnésio e pelo vermelho de rutênio (RUSSEAU *et al.*, 1988).

Com relação a concentração necessária para determinar a liberação de íons cálcio, é importante destacar que em concentrações relativamente baixas (< 2mM), o efeito da cafeína é dependente da presença de íons cálcio, enquanto

que em altas concentrações, a cafeína determina abertura dos canais na ausência de cálcio (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997).

Atualmente, é aceito que a cafeína promova liberação de cálcio dos estoques intracelulares em tecido muscular, bem como em outros tecidos não musculares, através de sua ação nos receptores rianodínicos (KIM *et al.*, 1997; HUANG, 1998; RITTER *et al.*, 2001). Dessa forma, esse composto é utilizado como um agonista em diferentes preparações que procurem estudar a liberação de íons cálcio através desse canal. Clinicamente, a cafeína pode ser usada para detectar doenças como a hipertemia maligna, que no ser humano caracteriza-se por contração muscular tônica, hipertemia e falência múltipla de órgãos. Os músculos de indivíduos afetados por esta patologia são caracterizados por aumento na sensibilidade de liberação de cálcio do RS pelo próprio cálcio, o qual seria induzido pela cafeína e/ou halotano (DENBOROUGH, 1998).

O dantrolene (1-((5-(p-nitrophenyl)furfurylidine)amino) hydantoin sodium) representa um derivado de hidantoína que atua como relaxante muscular, sendo utilizado como agente terapêutico na síndrome da hipertermia maligna (PALNITKAR *et al.*, 1997).

A síndrome da hipertemia maligna (SHM), em suínos e humanos, é uma rara condição hereditária, determinada por um gene autossômico dominante. Portadores dessa síndrome podem apresentar intenso espasmo muscular e dramática elevação da temperatura corporal quando são administrados certos fármacos (PALNITKAR *et al.*, 1997; SHOSHAN-BARMATZ E ASHLEY, 1998). Os fármacos mais comumente implicados incluem o suxametônio e anestésicos halogenados voláteis (halotano).

A hipertemia maligna resulta de uma desordem do mecanismo de acoplamento excitação-contração do músculo esquelético com liberação excessiva de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. Admite-se que essa síndrome esteja associada a mutações no gene que codifica os canais de cálcio (receptor rianodínico), entretanto outros sítios de mutação foram apontados nos genes codificadores das subunidades dos receptores diidropiridínicos (DENBOROUGH, 1998).

O dantrolene foi inicialmente sintetizado como um possível antibiótico, mas estudos *in vivo* em camundongos, demonstraram que esse composto induzia flacidez muscular quando injetado e que esse efeito era oriundo da inibição do mecanismo de acoplamento excitação-contração sem afetar a transmissão neuromuscular ou as propriedades elétricas do músculo (ELLIS, 1972). Outros estudos demonstraram que esse fármaco promovia relaxamento em contrações induzidas pelo halotano e caféina em músculos de pacientes com SHM, sendo um fármaco muito eficiente no tratamento dessa anomalia em suínos e humanos (HARRISON, 1975).

Estudos posteriores utilizando técnicas de fluorescência demonstraram que o dantrolene liga-se a microssomos oriundos do retículo sarcoplasmático (RS) isolado de músculo esquelético de coelho (DEHPOUR, 1982). Em membranas do RS, demonstrou-se que esse composto não exerce seu efeito farmacológico via estimulação da captação de cálcio pela bomba de cálcio presente no retículo sarcoplasmático (WHITE E DENBOROUGH, 1984).

Em retículo sarcoplasmático isolado demonstrou-se também que o dantrolene inibe a contração induzida pela cafeína e por despolarização (DANKO, 1985), e em fibras permeabilizadas de cobaio inibição da liberação de cálcio induzida pelo cálcio (OHTA, 1990). Nesse mesmo estudo também se demonstrou que esse fármaco não alterou a sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio (OHTA, 1990).

Resultados recentes demonstraram que o dantrolene bloqueia a liberação do íon cálcio do RS, por bloquear os receptores rianodínicos purificados e incorporados em lipossomos (FRUEN, 1997). Por outro lado, estudos realizados por Szentesi *et al.* (SZENTESI *et al.*, 2001), sugerem que o dantrolene atua em um sítio distinto ao anteriormente citado, pois segundo esses autores esse composto foi capaz de inibir a liberação de cálcio de vesículas de retículo sarcoplasmático isolado, mas não aboliu o efluxo de íons cálcio por meio de receptores rianodínicos incorporados em bicamadas lipídicas planares.

Esses autores sugerem que o dantrolene atue na membrana do RS, mas em um sítio diferente ao dos receptores rianodínicos. Entretanto, outros autores

sugerem que o dantrolene atue via receptores rianodínicos e que esse efeito não se restringe apenas a isoforma tipo 1 (RyR 1), mas também a isoforma tipo 3 (RyR 3) sem afetar a isoforma cardíaca (RyR 2) (ZHAO *et al.*, 2001; PAUL - PLETZER *et al.*, 2001).

Estudos utilizando [³H] azidodantrolene, apontam para a seqüência N-terminal (resíduos de aminoácidos 1-1400), como sendo o sítio de ligação do dantrolene nos receptores RyR 1, e nessa seqüência, os resíduos 590-609 formariam a região dos receptores RyR 1 onde ligar-se-ia o dantrolene (PLETZER-PAUL *et al.*, 2002).

Rianodina é um alcalóide vegetal neutro com ação inseticida tendo sido isolado de raízes e caule da planta *Ryania speciosa*. Dos extratos dessa planta são isolados dois componentes, com maior proporção, a rianodina e 9,21-didehidrorianodina. Os efeitos farmacológicos da rianodina em músculo estriado e liso foram inicialmente descritos em estudos realizados na década de 1960 (JENDEN E FAIRHURST, 1969).

Bianchi foi um dos primeiros investigadores a sugerir a interferência da rianodina nos mecanismo de liberação e captação de íons cálcio pelo retículo sarcoplasmático (BIANCHI, 1968).

Estudos realizados com músculo esquelético intacto descrevem que a rianodina promove contração irreversível e em fibras permeabilizadas a contração induzida pela rianodina mostra ser dependente da concentração de íons cálcio presentes na solução (LAMB e STEPHENSON, 1990; GARCIA *et al.*, 1991).

Os efeitos da rianodina no mecanismo de liberação de íons cálcio foram estudados em diferentes preparações. Essa substância liga-se a proteínas específicas situadas na porção terminal do retículo sarcoplasmático e seu modo de ação foi investigado em fragmentos do RS e em canais isolados e incorporados em bicamada lipídica (FLEISCHER *et al.*, 1985; MEISSNER, 1986; CAMPBELL *et al.*, 1987; LAI *et al.*, 1988 ; OYAMADA, 1993). Esses estudos sugeriram que a rianodina liga-se aos canais liberadores de cálcio presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), mantendo-os em um estado aberto (OYAMADA *et al.*, 1993).

Diferentes estudos descrevem que a rianodina apresenta ação complexa e dependente do tipo de músculo, padrão de estimulação do músculo e de sua concentração de rianodina, pois baixa e alta concentração desse alcalóide promovem efeitos distintos na retenção de íons cálcio pela fração pesada do RS (CORONADO *et al.*, 1994; MEISSNER, 1994; BIANCHI, 1997).

Em baixas concentrações (0,01-10 μM) determina liberação de íons cálcio, ao passo que altas concentrações (10- 300 μM), promove redução da condutância do canal, com bloqueio completo não interagindo com as moléculas que atuam como sensores de voltagem (CORONADO, 1994; GONZALES e CAPUTO, 1996; ZUCHI E RONCA-TESTONI, 1997; FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; COLLET E JACQUEMOND, 2002).

As alterações de comportamento dos receptores RyR, sugerem que a rianodina induz reorganização substancial do complexo protéico (receptor RyR) e/ou promove alterações conformacionais em cada subunidade, de forma irreversível (SHOSHAN-BARMATZ e ASHLEY, 1998).

O vermelho de rutênio (ruthenium red), $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}-\text{O}-\text{Ru}(\text{NH}_3)_4-\text{O}-\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_6$, é um corante policatiônico com estrutura linear que possui 14 grupamentos amino e três átomos de rutênio (ZUCHI E RONCA-TESTONI, 1997) .

Em diversos estudos o vermelho de rutênio demonstrou possuir um potente efeito inibidor da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, tanto em músculo esquelético quanto em cardíaco (SUZUKI *et al.*, 1980; KIM *et al.*, 1983; MEISSNER E HENDERSON, 1987; MA, 1993; XU *et al.*, 1999).

Estudos demonstram que a faixa de concentração efetiva desse corante situa-se entre 1 nM e 20 μM (ZUCHI e RONCA-TESTONI, 1997). Esse composto é amplamente utilizado como inibidor da liberação de íons cálcio induzida pelo cálcio (PHILLIPPE e BASA, 1996).

Estudos utilizando canais de cálcio incorporados em bicamada, avaliação de fluxos de cálcio a partir de vesículas do retículo sarcoplasmático e protocolos utilizando rianodina marcada radiativamente (rianodina $^{[3}\text{H}]$), foram fundamentais para descrever os efeitos do vermelho de rutênio na liberação de cálcio (SMITH *et*

al., 1985; MICHALAK *et al.*, 1988; CHU *et al.*, 1990; OGAWA e HARAFUJI, 1990; LINDSAY e WILLIAMS, 1991; XU *et al.*, 1999).

Esses trabalhos demonstraram que o vermelho de rutênio promove decréscimo na probabilidade de abertura do canal e inibição dos receptores RyR e da ligação da rianodina ao receptor RyR. O sítio de ligação do vermelho de rutênio estaria situado entre os resíduos 1861-2094 e 3657-3776 e segundo Ma (MA, 1993) esse sítio estaria localizado próximo ao poro do canal.

Outros estudos evidenciaram que esse composto atua também em músculo liso, inibindo a ligação dos íons cálcio a calmodulina, causando, dessa forma inibição da contração (SASAKI *et al.*, 1992).

Estudos realizados com músculo esquelético demonstraram também que o vermelho de rutênio, nas concentrações de 10-20 μM , foi capaz de abolir a liberação de íons cálcio induzido pelo InsP_3 (WATRAS e BENEVOLENSKY, 1987).

Os anestésicos locais, tais como a tetracaína e procaína são ferramentas farmacológicas utilizadas para o estudo do mecanismo de acoplamento excitação- contração em músculo de anfíbios e mamíferos. Essas substâncias promovem bloqueio da contração induzida por alta concentração de íons potássio (CAPUTO, 1976; OBA *et al.*, 1987) e determinam bloqueio da liberação de íons cálcio induzida pelo cálcio, pela cafeína e pela quercetina, um flavonóide que apresenta efeito duplo sobre o retículo sarcoplasmático, ou seja bloqueio da Ca^{2+} -ATPase e liberação de íons cálcio (ENDO, 1977; MORI e TONOMURA, 1983; KUBEBAYASHI e OGAWA, 1984; ANTONIU *et al.*, 1985; PALADE, 1987; KLEIN, 1992; XU *et al.*, 1993; GARCÍA e SCHNEIDER, 1995; CSERNOCH *et al.*, 1999).

Estudos utilizando diferentes preparações, tais como músculo intacto (FEINSTEIN, 1963; THORENS E ENDO, 1975), vesículas isoladas do RS (MORI E TONOMURA, 1983) e fibras permeabilizadas (ENDO, 1985), demonstraram que a procaína promove bloqueio da contração induzida pela cafeína, possivelmente pela inibição do mecanismo de liberação de cálcio induzida pelo cálcio (CICR) (ENDO, 1985). Esse bloqueio foi observado mesmo após a repolarização do sarcolema (KLEIN *et al.*, 1992); tendo sido demonstrado que a

ação da procaína (1 mM) não ocorre em nível do sensor de voltagem, mas num passo subsequente do mecanismo AEC (KLEIN *et al.*, 1992).

De forma semelhante, protocolos utilizando fibras intactas ou permeabilizadas bem como preparações com membrana isolada, demonstraram que a tetracaína promove bloqueio da liberação de íons cálcio induzida pela cafeína (ALMERS e BEST, 1976; CAPUTO, 1976; SATO *et al.*, 1984; PIKE *et al.*, 1989; VENOSA e HOYA, 1999).

Em estudo recente demonstrou-se que a tetracaína bloqueou as oscilações intracelulares de íons cálcio em preparações expostas a soluções de elevada tonicidade (CHAWLA *et al.*, 2001).

Outros estudos demonstraram que os anestésicos locais induzem contração muscular, inibem a Ca^{2+} -ATPase e estimulam ou potencializam a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, sendo que esse último efeito é dependente da concentração e das condições experimentais (HERBETTE *et al.*, 1982; VOLPE *et al.*, 1983; WOLOSKE *et al.*, 1992); Segundo, Pike e colaboradores (PIKE *et al.*, 1989), baixas concentrações tanto da tetracaína quanto da procaína promovem bloqueio da liberação de íons cálcio, enquanto altas concentrações induzem liberação de Ca^{2+} em fibras permeabilizadas de anfíbios ou mamíferos.

Estudos utilizando canal isolado evidenciaram que a procaína e a tetracaína determinam redução da probabilidade de abertura (P_o) do canal com IC_{50} de 0,1 a 0,6 mM para tetracaína e 4 mM para procaína (XU *et al.*, 1993; ZAHRANDNIKOVA e PALADE, 1993). Bloqueio dependente de voltagem foi observado quando concentrações na ordem de milimolar de tetracaína e procaína foram utilizadas na presença de 2 μM de rianodina o que induz o canal a um estado aberto com baixa condutância (XU *et al.*, 1993).

Estudos utilizando técnica para mensurar a ligação do alcalóide rianodina ao receptor demonstraram que em músculo esquelético, a tetracaína inibe a ligação da rianodina e a procaína promove decréscimo da ligação da rianodina ao receptor RyR (ZUCCHI e RONCA-TESTONI, 1997). Esses resultados sugerem que os anestésicos locais apresentam, pelo menos, duas formas diferentes de

ação: (i) redução da probabilidade de abertura do canal, associada a redução da afinidade da rianodina ao canal; (ii) bloqueio do canal de forma dependente de voltagem, resultando na redução da condutância do mesmo (ZUCCHI e RONCA-TESTONI, 1997).

Para compreender a relação existente entre a ação dos anestésicos locais com os receptores rianodínicos (RyR), foi construído um modelo para caracterizar o sítio ou sítios de interação entre o RyR e os anestésicos locais (SHOSHAN-BARMATZ e ZCHUT, 1993).

Esse modelo sugere a existência de uma proteína do RyR (denominada “protein pocket”) onde se liga a parte hidrofóbica dos anestésicos locais e sítios negativos e positivos onde se ligam pares de elétrons livres. Os efeitos duplos dos anestésicos locais poderiam ser explicados com base na posição dos grupos ligantes dos anestésicos locais e do receptor RyR (SHOSHAN-BARMATZ e ASHLEY, 1998).

A neomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que em diversas preparações de músculo esquelético promove bloqueio da liberação de Ca^{2+} induzido pelo Ca^{2+} , pela cafeína, pelo thymol e pela despolarização, através de sua ação nos receptores rianodínicos (MEISSNER e HENDERSON, 1987; CALVIELLO e CHIESI, 1989; WYSKOVSKY, *et al.*, 1990; SAYERS e MICHELANGELO, 1993; ZUCCHI e RONCA-TESTONI, 1997).

Contrariamente ao observado em músculo estriado, em diferentes preparações utilizando músculo liso verificou-se que esse antibiótico promove bloqueio da contração. Acredita-se que esse efeito é oriundo de sua ação inibidora da Fosfolipase C e, conseqüentemente, de sua ação sobre a síntese de trifosfato de inositol (InsP_3), um importante mensageiro na mobilização de íons cálcio dos estoques intracelulares (PALADE, 1987; PHILLIPPE, 1994).

Os efeitos da neomicina sobre a liberação de íons cálcio em músculo esquelético foi extensivamente investigada. Estudos utilizando liberação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a partir de tríades isoladas, demonstraram que a neomicina foi capaz de inibir a liberação de Ca^{2+} induzida pela cafeína e timol (PALADE, 1987). Como se sugeria o envolvimento do InsP_3 no mecanismo de AEC (VERGARA *et al.*, 1985, VOLPE

et al., 1985), efetuou-se a utilização de InsP_3 como possível agente mobilizador de íons cálcio. Entretanto o InsP_3 foi incapaz de induzir liberação de íons cálcio nessas preparações. Assim, não foi possível avaliar os efeitos da neomicina (PALADE, 1987).

Em preparações utilizando microsossomos provenientes de cerebelo de ratos esse antibiótico inibiu a liberação de cálcio induzida pelo InsP_3 (SAYERS e MICHELANGELO, 1993).

A utilização de frações isoladas da porção pesada do retículo sarcoplasmático permitiu evidenciar que a neomicina determina bloqueio da liberação de íons cálcio induzida pelo cálcio, AMP e cafeína (WYSKOVSKY *et al.*, 1990). Com o emprego de $[^3\text{H}]$ rianodina demonstrou-se que a neomicina promove, com alta afinidade, bloqueio da ligação da $[^3\text{H}]$ rianodina com as membranas do retículo sarcoplasmático (MACK *et al.*, 1992). Com o emprego da técnica de canal isolado e reconstituído em bicamada planar foi possível demonstrar que a neomicina (5 μM), reduzia a probabilidade de abertura do canal (WANG *et al.*, 1996).

Ensaio realizado após tratamento com tripsina confirmaram que os sítios de ligação da rianodina e da neomicina estão situados em um fragmento protéico com 76 kDa, que corresponde a região situada entre o resíduo de aminoácido Arg-4475 e a porção carboxi terminal (WANG *et al.*, 1996). Recentes investigações utilizando receptores rianodínicos isolados de cardiomiócitos de carneiros demonstraram que a neomicina interage com sítios situados na face citosólica e luminal dos receptores RyR (MEAD E WILLIAMS, 2002).

A heparina é um polissacarídeo sulfatado e representa uma importante ferramenta para os estudos da liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares, pois diferentes trabalhos demonstraram que essa substância é capaz de promover bloqueio da mobilização de Ca^{2+} induzida pela via sensível ao InsP_3 (LOPEZ e TERZIC, 1996).

Estudos de medida de tensão isométrica utilizando fibras musculares lisas provenientes de artéria pulmonar de coelho, permeabilizada com saponina, demonstraram, pela primeira vez, que a heparina promovia bloqueio da liberação

de íons cálcio do retículo sarcoplasmático quando a fibra era exposta a solução contendo InsP_3 e não abolia a contração induzida pela exposição da fibra a cafeína, que fora abolida pela prévia incubação da fibra com procaína (KOBAYASHI *et al.*, 1988).

Pela utilização de microssomos isolados de cérebro de cães (PALADE *et al.*, 1989) demonstrou-se que a heparina promovia bloqueio da liberação de íons cálcio pela via do inositol trifosfato, bem como inibia a ligação do InsP_3 marcado radiativamente às vesículas isoladas. De forma complementar evidenciou-se também que não havia bloqueio da liberação de cálcio por meio dos canais sensíveis a cafeína. Esses dados sugerem que a liberação de íons cálcio induzida pela cafeína e pelo InsP_3 poderia ocorrer, em tecido neuronal, através de diferentes canais (PALADE *et al.*, 1989).

A utilização da heparina em preparações de músculo estriado esquelético com o objetivo de bloquear a liberação de íons cálcio do RS revela diferentes resultados em diferentes protocolos. Utilizando eletrodos seletivos para mensuração de íons cálcio e técnicas de fluorescência (RITOV *et al.*, 1985), demonstrou-se que a heparina ($0,5 - 10 \mu\text{g. ml}^{-1}$), promove a liberação de Ca^{2+} da cisterna terminal do retículo sarcoplasmático, mas não da porção longitudinal, através de uma via sensível ao vermelho de rutênio. Outros estudos utilizando a técnica anteriormente citada demonstraram que a liberação induzida pela heparina é independente do mecanismo de liberação de íons cálcio induzida pelo cálcio dependente de magnésio, e que a prévia liberação de cálcio promovida pela cafeína, não prevenia o efluxo de Ca^{2+} induzido pela heparina (MENSHIKOVA *et al.*, 1986).

Outros estudos utilizando canais isolados, demonstraram que a heparina promove aumento da probabilidade de abertura do canal de receptores rianodínicos e esse evento é dependente de íons cálcio (BEZPROZYNANNY *et al.*, 1993).

Esses resultados têm sido interpretados com base da hipótese de que a heparina, nessas condições, promove incremento de íons cálcio próximos ao

sítios regulatórios dos receptores rianodínicos (ZUCCHI e RONCA-TESTONI, 1997).

Por meio da despolarização de fibras musculares intactas de anfíbios, após microinjeção de heparina demonstrou-se que esse composto não aboliu a liberação de íons cálcio. Esse resultado argüiu contra a participação do InsP_3 como mediador principal no mecanismo de acoplamento excitação contração em músculo esquelético (PAPE *et al.*, 1988), já que a heparina, um clássico bloqueador do inositol trifosfato, foi incapaz de abolir o efeito da despolarização, determinando liberação de íons cálcio.

Estudos utilizando fibras musculares mecanicamente permeabilizadas de rãs, demonstraram que a presença de InsP_3 promove a liberação de íons cálcio que não era abolida, nessa preparação, pela heparina (ROJAS e JAIMOVICH, 1990). Entretanto, estudos utilizando microinjeção de heparina evidenciaram o bloqueio do mecanismo de acoplamento excitação contração em fibras permeabilizadas de sapos (LAMB *et al.*, 1994).

Outros trabalhos, recentemente publicados, têm atribuído um papel importante desse composto na demonstração da liberação de cálcio via InsP_3 em diferentes preparações de células musculares esqueléticas, tanto de mamíferos quanto de anfíbios (LOPEZ e TERZIC, 1996; TALON *et al.*, 1997; CATINOT *et al.*, 1998; TALON *et al.*, 1999, TALON *et al.*, 2000; ESTRADA *et al.*, 2001; TALON *et al.*, 2002; ARAYA *et al.*, 2003).

Assim a heparina representa uma ferramenta importante no estudo do mecanismo de acoplamento excitação-contração, pois, provavelmente, atue como antagonista da mobilização de íons cálcio mediada pelo InsP_3 (MARUYAMA *et al.*, 1997; CHAWLA *et al.*, 2001; BILMEN *et al.* 2002).

Óleos essenciais são produtos de origem vegetal que apresentam composição complexa, sendo oleosos e voláteis e extraídos de diferentes espécies vegetais. Apresentam muitas aplicações na indústria, para a produção de perfumes e aromatizar alimentos, bem como na medicina popular, atuando como sedativos, antiparasitários, diuréticos, analgésicos, antiespasmódicos e hipotensores (CRAVEIRO *et al.*, 1977). Diversos constituintes dos óleos

essências, tais como óxido de piperitenona, anetol, estragol e eugenol, apresentam marcantes efeitos sobre tecidos excitáveis (LEAL-CARDOSO e FONTELES, 1999).

Atualmente alguns componentes de óleos essenciais, tais como anetol, estragol, óxido de piperitenona e eugenol, e alguns de seus análogos, como o benzileugenol, demonstraram ser capazes de alterar o mecanismo de acoplamento excitação-contração (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1988/1989; ALBUQUERQUE *et al.*, 1995; COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997; ALBUQUERQUE *et al.*, 1995; FOGAÇA *et al.*, 1997; LEAL-CARDOSO e FONTELES, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2000; LOFRANO-ALVES, *et al.*, 2000).

Estudos realizados com tecido muscular esquelético demonstraram que o óxido de piperitenona em baixas concentrações ($1-100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) não modifica o tônus muscular promovendo, entretanto, bloqueio da contração induzida pela exposição do músculo à solução contendo alta concentração de íon potássio. No entanto, em concentrações elevadas ($1-6 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$) induz contração muscular que foi bloqueada quando o músculo foi pré-incubado com procaina (10 mM) (FOGAÇA *et al.*, 1997). Em músculo liso o óxido de piperitenona apresenta efeito miorelaxante (LEAL-CARDOSO e FONTELES, 1999).

O anetol e o estragol atuam como agentes relaxantes de músculo liso (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995; COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997). Estudos realizados em músculo esquelético intacto demonstraram que o anetol determina de forma dose-dependente bloqueio da contração evocada por solução de Ringer contendo 100 mM de potássio (GUEDES *et al.*, 1999) e potencializa as contrações induzida por cafeína 2 mM (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995; GUEDES *et al.*, 1999) e pelo íon perclorato ($\geq 10 \text{ mM}$), em solução contendo 4 mM de K^+ (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Esse efeito potencializador do anetol da contração induzida pela cafeína, foi bloqueado pela pré-exposição do músculo a procaina (10 mM) (ALBUQUERQUE, *et al.*, 1995).

Estudos efetuados com estragol em músculo esquelético demonstraram que esse composto promove potencialização da contração induzida por cafeína

(2 mM em solução Ringer 4 mM de K^+) e que esse efeito foi de forma marcante reduzido quando o músculo foi pré-incubado com procaína (10 mM) (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995).

O eugenol (2-Methoxy-4-[2-propenyl]phenol) é um composto extraído de plantas da espécie *Caryophyllus aromaticus* L. (cravo-da-índia), bem como de plantas do gênero *Croton*, presentes na flora do nordeste brasileiro (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994). É um composto utilizado na indústria de alimentos, para acentuar aroma e paladar e na manufatura de cosméticos (CRAVEIRO *et al.*, 1977). Apresenta aplicações na medicina popular, como agente terapêutico em distúrbios gastrointestinais (NISHIJIMA *et al.*, 1998) e sendo comumente utilizado em odontologia para alívio de dores oriundas de pulpite dentária (NISHIJIMA *et al.*, 1999). Estudos realizados com tecidos excitáveis têm descrito diversos efeitos do eugenol em preparações *in vivo* ou *in vitro*.

Em preparações utilizando camarão-de-água-doce demonstrou-se efeito depressor na terminação neuro-muscular (OZEKI, 1975). Em estudos utilizando a preparação nervo frênico-diafragma de ratos, sugeriu-se que esse composto apresenta uma ação estabilizadora de membrana ou atue como uma droga com efeito anestésico (BRODIN e ROED, 1984).

Estudos recentes, analisando o efeito anestésico de monoterpenos e fenilpropanos, demonstraram que o eugenol não possui ação de anestésico local em modelos experimentais utilizando reflexo conjuntival de coelhos (GHELARDINI *et al.*, 2001).

Efeito depressor do eugenol sobre o sistema nervoso central de cães também foi sugerido visto que a injeção intravenosa desse composto promove a perda da função motora dos membros posteriores, ataxia e inconsciência nesses animais (STICHT e SMITH, 1971).

Estudos utilizando derivados do eugenol (metileugenol), indicam que esses compostos promovem efeito anestésico em ratos (SELL e CARLINI, 1976). Trabalhos com extratos vegetais contendo eugenol, demonstraram efeitos psicofarmacológicos (CARLINI *et al.*, 1983). Os derivados do eugenol (fenil-,

benzil- e feniletil-) mostraram efeitos anticonvulsivantes em outros modelos experimentais (DALLMEIER *et al.*, 1983).

Tem sido observado que o eugenol promove redução da vasoconstrição evocada por norepinefrina, histamina e estimulação simpática peri-arterial em artéria auricular de coelho (HUME, 1983). Efeito relaxante de músculo liso traqueal e de musculatura do íleo de cobaio, também, tem sido observado (REITER e BRANDT, 1985). Outros estudos têm demonstrado bloqueio da contração induzida por solução com elevada concentração de K^+ (90 mM), em músculo liso vascular de coelho (NISHIJIMA *et al.*, 1998; NISHIJIMA *et al.*, 1999). Indução de relaxamento em musculatura de íleo de rato por um mecanismo independente da alteração do potencial transmembrana e do influxo de cálcio também tem sido demonstrado (LEAL-CARDOSO *et al.*, 2002).

O eugenol induz efeito vasorelaxante oriundo, provavelmente, do bloqueio de canais sensíveis à voltagem e operados por receptor, os quais são modulados pelo óxido nítrico produzido no endotélio (DAMIANI *et al.*, 2003). Efeito vasodilatador também foi observado em experimentos utilizando leito vascular mesentérico de rato (CRIDDLE *et al.*, 2003).

Em experimentos de fisiologia cardiovascular indicam que administração intravenosa de eugenol em cães promove forte redução da pressão arterial, de forma transiente, bem como na força de contração miocárdica, sem marcante alteração da frequência cardíaca (STICHT e SMITH, 1971). Estudos recentes indicam que o eugenol possui efeito inotrópico negativo sobre músculos papilares de cobaio (SENSCH *et al.*, 2000), sendo esse efeito, provavelmente, oriundo do bloqueio de canais de cálcio de membrana (DAMIANI, 2003).

Estudos demonstraram que o eugenol, em baixas concentrações (0,1-2 mM) promove bloqueio da contração induzida pela exposição de músculo sartório de sapo à solução de Ringer contendo 100 mM de K^+ e em altas concentrações ($\geq 2,8$ mM) induz contração *per se* (LEAL-CARDOSO, 1994).

Essa contração parece ser independente do potencial transmembrana, pois foi observada em preparações mantidas em solução de Ringer contendo 80 ou 100 mM de potássio, condição essa, capaz de promover inativação dos

mecanismos contráteis desencadeados pela despolarização da membrana celular (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994; LOFRANO-ALVES, *et al.*, 2000; SILVEIRA-GOMES, 2000).

Nos estudos realizados por Leal-Cardoso *et al.* (LEAL-CARDOSO *et.al.*, 1994), demonstrou-se que o eugenol, em baixas concentrações, potencializa as contrações induzidas pela cafeína (2 mM) ou por baixas temperaturas. Em concentrações acima de 10 mM, a contração promovida por esse composto foi independente do cálcio oriundo do meio externo. Esses resultados sugerem que o efeito do eugenol não é ocasionado pela despolarização do sarcolema ou pelo incremento do influxo de íons cálcio, mas pela liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático (RS) (LEAL-CARDOSO *et.al.*, 1994).

Resultados experimentais sugerem que o efeito do eugenol decorre da liberação de íons cálcio do RS por um mecanismo diferente daquele da cafeína. Isso porque a presença de um derivado do eugenol, o benzil-eugenol, bloqueou a resposta de contração promovida pelo eugenol, sem afetar a contração evocada pela exposição do músculo a cafeína (LEAL-CARDOSO, *et al.*, 1988/89).

Estudos utilizando músculo sartório de rã evidenciaram que o eugenol promove contração em fibras quimicamente permeabilizadas com saponina e não altera a sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio (LOFRANO-ALVES *et al.*, 2000; SILVEIRA-GOMES, 2000).

A despeito dos resultados já observados, os mecanismos de ação do eugenol em músculo esquelético, ainda necessitam de maiores estudos para sua melhor compreensão. O esclarecimento desses efeitos poderá fornecer novos subsídios para melhor conhecimento do processo de acoplamento excitação-contracção.

1.6 Objetivos

- 1) Avaliar os efeitos do eugenol no processo de acoplamento excitação-contração em fibras musculares intactas.
- 2) Analisar os efeitos de antagonistas de canais de Ca^{2+} sobre a contração induzida pelo eugenol em fibras musculares intactas.
- 3) Investigar os efeitos do eugenol ao nível subcelular (retículo sarcoplasmático e sistema contrátil), empregando-se a técnica de fibra muscular permeabilizada por saponina ou Triton X100.
- 4) Analisar os efeitos de diferentes antagonistas de canais de Ca^{2+} sobre a contração induzida pelo eugenol, em fibras musculares permeabilizadas por saponina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção e sacrifícios dos animais

Neste estudo foram utilizados músculo sartório e peitoral abdominal (*M. peitoralis abdominalis*) (BURTON, 1980), proveniente de *Rana catesbiana* (rã) de ambos os sexos, pesando de 100 a 200 gramas, fornecida por criador da região metropolitana de Curitiba. Os animais foram mantidos no ranário do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, e alimentadas *ad libitum*. Todos os procedimentos e técnicas utilizados nesse trabalho foram realizados seguindo as normas estabelecidas pela declaração de Helsinki de 1989 para cuidados e uso laboratorial de animais.

O sacrifício dos animais foi realizado por meio da destruição da medula espinhal e do encéfalo mediante uso de estilete. Após esse procedimento realizou-se a dissecação dos músculos sartório ou peitoral abdominal, conforme protocolo experimental.

Durante a dissecação, os músculos foram constantemente umedecidos com solução de Ringer batráquio modificada, apresentando a seguinte composição (em mM) : NaCl 142.5, KCl 4.0, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.8, Hepes 10 (tamponado com HCl), Glucose 10, pH 7.4. As soluções foram preparadas e mantidas a temperatura ambiente.

Todos os experimentos foram realizados no laboratório de Fisiologia da Contração Muscular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, entre os meses de abril de 2001 a fevereiro de 2003.

2.2 Músculo intacto de anfíbio

Após sacrificados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre mesa cirúrgica, tendo os membros fixados com alfinetes. Os músculos sartório e peitoral abdominal foram então dissecados de acordo com o procedimento padrão

que envolve retirada da pele e remoção do músculo com uso de instrumental cirúrgico.

Após dissecação os músculos foram transferidos para placas de Petri, previamente preparadas, com fundo contendo silicone para fixação, sendo mantidos imersos em solução de Ringer com $[K^+] = 4\text{mM}$ (Ringer Normal) (vide tabela 1) aerada a temperatura ambiente e com pH ajustado para 7,4.

As peças de músculo sartório eram transferidas para uma câmara de acrílico cilíndrica vertical, com capacidade para 15 ml, contendo solução de Ringer Normal, aerada, mantida a temperatura ambiente e pH 7.4.

Para o registro das contrações isotônicas o músculo teve uma de suas extremidades fixada ao fundo da câmara e a outra conectada a uma alavanca para o registro em quimógrafo (ZimMermann Leipzig- série 1878). A amplificação do registro em papel foi de 2.5 vezes.

No início de cada experimento foi permitido ao músculo equilibrar-se durante 20 minutos em solução de Ringer Normal. O músculo sartório foi submetido aos diferentes protocolos experimentais a partir do enchimento direto da câmara pela extremidade superior, sendo seu esvaziamento obtido pelo uso um sistema de esgotamento situado em sua base. As medidas do comprimento do músculo foram realizadas no início e final de cada abordagem experimental.

O músculo peitoral abdominal, mantido em placa de Petri contendo solução de Ringer Normal, com fundo contendo borracha silicone, foi fixado em suas extremidades tendinosas por meio de alfinetes. Com o auxílio de um estereomicroscópio binocular bem como de pinças e tesoura oftálmica, foram efetuados cortes longitudinais paralelos as células musculares com o objetivo de se obter feixes, com cerca de 0,1 a 0,15 cm de largura.

Cada feixe intacto teve uma de suas extremidades fixada a um transdutor de força (Scientific Instruments G.M.B.H., Heidelberg, República Federal da Alemanha), mantido em posição estacionária e a outra a um braço móvel, mediante pinças de aço inoxidável. O registro da força de contração foi obtido com auxílio de um polígrafo (Gold Corporation, Cleveland, modelo 2108 XX).

Um conjunto de câmaras, com capacidade de 2.5 ml (cada câmara), construídas num bloco móvel de acrílico, permitiu que o feixe fosse submetido a diferentes protocolos experimentais. As soluções foram constantemente agitadas mediante barras de aço inoxidável magnetizadas por um agitador.

Tanto para os protocolos realizados com músculo sartório quanto para o músculo peitoral abdominal as substâncias empregadas, – eugenol, agonistas e antagonistas dos receptores diidropiridínicos e rianodínicos-, foram adicionadas diretamente na solução de Ringer Normal ou na solução com $[K^+] = 100\text{mM}$ (vide tabela 1).

2.2.1 Experimentos realizados com eugenol em músculo sartório intacto de anfíbio

Os valores de encurtamento muscular obtidos em diferentes condições experimentais foram normalizados para aqueles induzidos por 100 mM de K^+ . Após a contração induzida pela solução com $[K^+] = 100\text{ mM}$ ter alcançado o estado estacionário o músculo foi relaxado pela substituição isosmótica da solução de banho pela solução de Ringer Normal.

Nas condições controle, o intervalo de tempo entre uma contração induzida por $[K^+] = 100\text{ mM}$ e outra foi de 20 minutos, o que demonstrou ser suficiente para que a preparação respondesse com uma variabilidade de amplitude de no máximo 20%.

Em uma série de protocolos avaliou-se o efeito de concentrações crescentes de eugenol (1, 3 e 10 mM) em preparações mantidas em solução de Ringer Normal. Inicialmente foram estudadas as contrações induzidas pela solução contendo 100 mM de K^+ e a seguir o músculo foi mantido em solução de Ringer Normal, à qual adicionou-se, de forma cumulativa, volumes suficientes de uma solução contendo eugenol para se obter concentrações finais de 1, 3 e 10 mM dessa substância.

Em outra série de experimentos avaliou-se o efeito do eugenol 10mM em preparações mantidas em solução de Ringer Normal ou com 100 mM de K^+ . Para

tal, após terem obtidas as contrações induzidas por 100 mM de íon K^+ , adicionou-se eugenol na solução de Ringer Normal.

Nos experimentos realizados com solução contendo $[K^+] = 100\text{mM}$, após as obtenções das contrações induzidas pela própria solução foi permitido que o músculo relaxasse nessa solução. O eugenol foi então adicionado a essa solução e após a contração resultante ter atingido o estado estacionário, a solução de banho era trocada pela de Ringer Normal na ausência desse composto. Quando possível as preparações foram submetidas a nova contração induzida pela solução com $[K^+] = 100$.

2.2.2 Experimentos com eugenol em músculo peitoral abdominal de anfíbio

A medida da força de contração isométrica obtida foi para cada teste normalizada para aquelas obtidas em solução com $[K^+] = 100\text{mM}$. Após a contração isométrica induzida por essa solução ter alcançado o estado estacionário o feixe muscular foi relaxado por meio de sua transferência para a câmara contendo solução de Ringer Normal.

Nas condições controle, o intervalo de tempo entre uma contração induzida por 100 mM de íon K^+ e outra foi de 20 minutos, o que demonstrou ser suficiente para que a preparação respondesse com uma variabilidade de amplitude de no máximo 20%.

Nesses protocolos foram avaliados o efeito de uma única concentração de eugenol (10mM), bem como os de diferentes concentrações (1, 3 e 6 mM) desse composto, em preparações mantidas em solução de Ringer Normal.

Nas preparações onde se avaliou o efeito de uma única concentração de eugenol, após terem sido obtidas as contrações induzidas por solução com $[K^+] = 100\text{mM}$, os feixes foram transferidos para a câmara apresentando solução de Ringer Normal. A seguir eugenol (10 mM) era adicionado a essa solução e após ter as contrações atingido o estado estacionário, cada feixe foi novamente transferido para a solução de Ringer Normal.

Nas preparações onde foi testada a curva dose-efeito do eugenol, após terem sido obtidas as contrações induzidas pela solução contendo $[K^+] = 100\text{mM}$, as peças musculares foram expostas as concentrações cumulativas de eugenol (1, 3 e 6 mM), o qual foi adicionado a solução de Ringer Normal. O tempo de exposição das preparações, a cada concentração de eugenol, foi suficiente para obter-se o estado estacionário da resposta contrátil. Após a obtenção da resposta contrátil a 6 mM de eugenol, a preparação era então exposta à solução de Ringer Normal, na ausência de eugenol.

2.2.3 Experimentos realizados com eugenol (10 mM) e nifedipina ($100\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$), em músculo sartório intacto de anfíbio

Nesse protocolo foi avaliado o efeito da nifedipina ($100\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$), um conhecido antagonista de canais lentos de Ca^{2+} (FILL e BEST, 1989), na contração induzida pelo eugenol (10 mM) em solução de Ringer Normal, na qual o íon cálcio foi suprimido e substituído por EGTA na concentração final de 1mM (solução “zero cálcio nominal”).

Devido a nifedipina ser fotossensível, as câmaras cilíndricas foram envolvidas com papel alumínio e os experimentos foram realizados no período noturno na ausência de fontes de luz.

Após as contrações isotônicas induzidas por $[K^+] = 100\text{mM}$ terem atingido o estado estacionário, efetuou-se substituição da solução de banho pela de Ringer Normal/ Ca^{2+} zero. A seguir, o músculo permaneceu nesta solução contendo nifedipina na concentração de $100\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$, por um período de incubação de 30 minutos. Ao final desse tempo substitui-se essa solução pela solução contendo 100 mM de íon K^+ sem íon cálcio contendo 1 mM de EGTA e nifedipina ($100\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$), com objetivo de analisar o efeito da nifedipina sobre a contração induzida por 100 mM de K^+ , na ausência de fonte extracelular de Ca^{2+} .

Após esse procedimento o músculo foi mantido, novamente, em solução zero cálcio nominal contendo nifedipina por um período adicional de 30 minutos. Ao final desse tempo adicionou-se eugenol, a partir de solução-estoque, com objetivo de atingir uma concentração final de 10mM desse composto. Essa

segunda parte do protocolo procurou avaliar o efeito da nifedipina e a influência da Ca^{2+} do meio extracelular, na contração induzida pelo eugenol 10mM.

2.2.4 Experimentos realizados com eugenol (10 mM), cafeína (10 mM) e procaína (10 mM) em músculo sartório intacto de anfíbio

Com objetivo de se avaliar o efeito da procaína (10 mM), um antagonista dos canais de vazantes de Ca^{2+} presentes na membrana do retículo sarcoplasmático, (SHOSHAN-BARMATZ e ASHLEY, 1998), sobre a contração induzida pela cafeína (10mM) e por concentrações crescentes de eugenol (1, 3 e 10 mM) , foram obtidas, inicialmente, as contrações por meio da exposição do músculo a solução contendo $[\text{K}^+] = 100\text{mM}$.

Após atingir o estado estacionário o músculo foi mantido em solução de Ringer Normal e procaína (10 mM) por um período de incubação de 30 minutos antes de se efetuar a adição de cafeína (10 mM) diretamente na câmara cilíndrica. O uso da cafeína serviu como controle para avaliação da capacidade de bloqueio da contração induzido pela procaína.

Após esse procedimento o músculo foi mantido novamente em solução contendo solução Ringer Normal e procaína 10mM por um período adicional de 30 minutos. Ao final desse período adicionou-se o eugenol de forma cumulativa a obter-se concentrações finais de 1, 3 e 10 mM desse composto (na presença procaína 10mM).

Em outro protocolo foi avaliado o efeito da procaína (10 mM), na contração induzida pelo eugenol (10 mM). Para tal, após a contração muscular induzida por 100 mM de K^+ ter sido obtida, o músculo foi relaxado e mantido , em solução Ringer Normal contendo procaína , por um período de 60 minutos antes da adição de eugenol.

2.2.5 Experimentos realizados com tetracaína (10 e 20 mM) , cafeína (10mM) e eugenol (10mM), em músculo sartório intacto de anfíbio

Após ter sido testado o efeito da procaína (10mM), na contração isotônica induzida pela cafeína (10mM) e pelo eugenol (1, 3 e 10 mM), presentes em solução de Ringer Normal , testou-se o efeito da tetracaína (10 mM) , um anestésico local que atua bloqueando a contração induzida pelo íon K^+ e pela cafeína (SATO *et al*, 1984; OBA *et al*, 1987).

Após a contração induzida por 100 mM de K^+ o músculo foi incubado por 30 minutos em solução de Ringer Normal à qual foi adicionada tetracaína (10mM). Após esse intervalo de tempo o músculo foi exposto a solução contendo 100 mM de íon K^+ e tetracaína, com objetivo de analisar o efeito desse anestésico sobre a contração induzida por 100 mM de K^+ .

A seguir, o músculo foi novamente mantido em solução de Ringer Normal contendo tetracaína na concentração de 10mM por 30 minutos adicionais. Ao final desse período, cafeína foi adicionada diretamente a essa solução com concentração final de 10mM. Após um período de 10 minutos o músculo foi novamente mantido em solução de Ringer Normal com tetracaína à qual se adicionou eugenol na concentração final de 10 mM. Como a contração induzida pelo eugenol, na maioria dos músculos testados, teve um caráter irreversível, utilizou-se o músculo contra lateral do mesmo animal para se avaliar isoladamente o efeito da tetracaína sobre a contração induzida pelo eugenol (10mM).

Após obtida a contração induzida por 100 mM de K^+ o músculo foi relaxado em solução de Ringer Normal, contendo tetracaína (10 mM), por um período de 30 minutos. Após esse período o músculo foi exposto à solução contendo 100 mM de K^+ na presença de tetracaína. Após esse procedimento o músculo foi novamente incubado em solução de Ringer Normal contendo tetracaína 10 mM , por um período adicional de 30 minutos. Ao final deste tempo eugenol foi adicionado à solução para obter-se uma concentração final de 10 mM.

O mesmo protocolo foi empregado em outros experimentos com o objetivo de se verificar o efeito da tetracaína (20 mM), na contração induzida por eugenol (10 mM).

2.2.6 Experimentos realizados com procaína (10 e 30 mM) , cafeína (10mM) e eugenol (1, 3 , 6 e 10mM) em músculo peitoral abdominal intacto de anfíbio

Após ter analisado o efeito da procaína (10 mM), sobre a contração induzida pela cafeína (10mM) ou pelo eugenol (10mM) ,presentes em solução de Ringer Normal , em músculo sartório de anfíbio, avaliou-se o efeito desse anestésico em preparações de músculo peitoral abdominal, mantida em solução de Ringer Normal contendo cafeína e eugenol. Para isso, os feixes de células musculares foram inicialmente expostos à solução de Ringer Normal por um período de 15 minutos e, a seguir transferidos para a câmara contendo solução 100 mM de K^+ . Ao atingir o estado estacionário de contração o feixe de células foi então transferido para solução de Ringer Normal. Manteve-se um intervalo de tempo entre as contrações induzidas por 100 mM de K^+ de, no mínimo, 15 minutos.

Após repetir de 3 a 4 contrações induzidas por 100 mM de K^+ , os feixes foram transferidos para solução de Ringer Normal contendo procaína 10 mM e mantidos sob incubação por 30 minutos. Ao final desse período, os feixes de células musculares foram mergulhando em solução contendo 100 mM de K^+ e procaína e novamente transferido para a solução de Ringer Normal contendo procaína 10mM onde foram mantidos por um período de 30 minutos adicionais.

A seguir, cada feixe foi transferido para a câmara contendo solução de Ringer Normal, procaína e cafeína. Os feixes de células foram mantidos nessa solução por cerca de 1 minuto, retornando em seguida para a solução de Ringer Normal contendo procaína. Esse período de incubação foi de 30 minutos e ao final do mesmo os feixes foram transferidos para solução de Ringer Normal contendo procaína e eugenol.

Em outros experimentos avaliamos os efeitos de procaína (30 mM) na contração induzida por 100 mM de K^+ ou eugenol (1, 3 e 6 mM). Inicialmente registrou-se as contrações induzidas por 100 mM de K^+ na ausência desse anestésico. A seguir, a preparação foi incubada por 30 minutos na solução de Ringer Normal, e após esse período os feixes foram expostos a uma solução de Ringer contendo 100 mM de K^+ , na presença de procaína. Após esse procedimento a preparação retornou à solução de Ringer Normal contendo procaína. Decorridos 30 minutos, adicionou-se a essa solução, de forma cumulativa, o eugenol nas concentrações de 1, 3, 6 e 10 mM. O tempo de exposição da preparação a cada concentração de eugenol foi suficiente para se obter o estado estacionário de contratilidade.

2.2.7 Experimentos realizados com rianodina (100 μ M), cafeína (10mM) e eugenol (10mM), em músculo peitoral abdominal intacto de anfíbio

Este protocolo foi realizado para verificar o efeito da rianodina (100 μ M), um composto que atua bloqueando dos receptores rianodínicos (CORONADO *et al*, 1994), nas contrações induzidas pela cafeína (10mM) e pelo eugenol (10mM). Para tal, os feixes de células foram inicialmente mantidos em câmaras contendo solução de Ringer Normal por um período superior a 15 minutos com objetivo de estabilizar a preparação.

Ao final desse intervalo de tempo, cada feixe foi submetido a três contrações induzidas por solução contendo 100 mM de K^+ e relaxadas em solução de Ringer Normal. A seguir, a preparação foi transferida para a câmara contendo solução de Ringer Normal, na qual adicionou-se rianodina (100 μ M).

Em todos os feixes de células utilizados, a rianodina induziu contrações que após terem atingido o estado estacionário relaxaram espontaneamente. Após o intervalo de tempo de 2 horas (na presença de rianodina), a preparação foi transferida para a câmara contendo solução de Ringer 100 mM de K^+ . A seguir, os feixes de células foram transferidos para a câmara contendo Ringer Normal. Na

seqüência e na mesma condição experimental, a preparação foi exposta a cafeína (10 mM) e ao eugenol (10 mM).

2.2.8 Experimentos utilizando dantrolene (5mg. ml⁻¹) e/ou eugenol (6 mM), em músculo peitoral abdominal intacto de anfíbio

Objetivando avaliar o efeito do dantrolene (5mg. ml⁻¹) - um agente químico que inibe a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático em fibra estriada esquelética (FRUEN *et.al.*, 1997) - na contração induzida por eugenol 6 mM , realizamos experimentos com feixes de células intactas.

Para isso, cada feixe de células foi mantido inicialmente em solução contendo solução de Ringer Normal por um período de no mínimo 15 minutos para estabilização da preparação. A seguir, cada feixe foi submetido a contrações induzidas por solução de Ringer contendo 100 mM de K⁺ e, ao atingir o estado estacionário foram transferidas para solução de Ringer Normal a fim de se obter completo relaxamento.

Após o procedimento inicial a preparação foi mantida em câmara contendo solução de Ringer Normal na qual se adicionou dantrolene (5mg. ml⁻¹). Nessa condição, o feixe de células foi incubado por um período de 30 minutos. Após esse intervalo de tempo a preparação foi transferida para câmara contendo solução de Ringer 100 mM de K⁺ a qual foi adicionado dantrolene para obtenção de uma concentração final de 5 mg.ml⁻¹.

Tendo sido verificado completo bloqueio da contração induzida pela solução Ringer 100 mM de K⁺, em todas as preparações testadas , cada feixe de células foi novamente mantido sob incubação , por um período adicional de 30 minutos, em solução de Ringer Normal e dantrolene 5mg. ml⁻¹. Ao final, os feixes foram então transferidos para câmaras contendo solução de Ringer 4 mM de K⁺ na presença de dantrolene (5mg/ml) e eugenol (6mM).

2.3 Preparação da fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada pelo uso de saponina

Após dissecação o músculo sartório foi transferido para um câmara, com capacidade de 3 ml, contendo solução R (solução relaxante, vide tabela 2). Com uso de pinças oftalmológicas e sob estereomicroscópio, promoveu-se o isolamento de feixes de fibras musculares que foram transferidos para outra câmara contendo solução R à qual foi adicionada saponina na concentração final de $30 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Esse glicosídeo atua interagindo com moléculas de colesterol presentes na bicamada lipídica do sarcolema e no sistema tubular transverso, ocasionando remoção desse lipídio de cadeia planar e promovendo perfurações na membrana (LAUNIKOS e STEPHENSON, 1997). Essas estruturas são seletivamente permeabilizadas, pois os outros sistemas de membranas são destituídos de colesterol (MEISSNER e FLEISHER, 1971).

Assim, com a utilização dessa técnica o RS bem como o sistema contrátil são mantidos íntegros e funcionais. Dessa forma torna-se possível o acesso dos constituintes das soluções ao retículo sarcoplasmático e sistema contrátil, permitindo o estudo dos mecanismos de liberação e captação de íons cálcio do RS do músculo esquelético, cardíaco e liso.

Com a utilização dessa técnica, foi possível avaliar os efeitos de antagonistas de canais de cálcio da cafeína e eugenol, na liberação desse íon.

Após o tratamento do feixe de fibras com saponina, por um período de 30 minutos, efetuou-se a transferência da preparação para uma solução de idêntica composição, exceto pela ausência desse glicosídeo. A seguir, com o auxílio de estereomicroscópio binocular bem como de pinças e tesoura oftalmológicas, promoveu-se o isolamento de uma única fibra a qual teve uma das extremidades fixadas a um transdutor de força (Scientific Instruments G.M.B.H., Heidelberg, República Federativa da Alemanha), mantido em posição estacionária e a outra a um braço móvel, mediante o uso de pinças de aço inoxidável.

O registro da força de contração foi então monitorado realizado em polígrafo (Gold Corporation, Cleveland, modelo 2108 XX). Um conjunto de

câmaras, com capacidade para 2,5 ml (cada câmara), construídas num bloco de móvel acrílico permitiu que a fibra fosse submetida a diferentes protocolos experimentais. As soluções foram constantemente agitadas mediante barras metálicas magnetizadas por agitador.

As FME, quimicamente desmembranadas, foram então expostas a diferentes soluções experimentais de acordo com o protocolo desejado. Os experimentos de medida de força de contração isométrica foram realizados transferindo-se cada FME para diferentes soluções, presentes nas câmaras. Com esse procedimento, uma mesma fibra foi submetida a diferentes protocolos experimentais e dessa forma foi possível utilizar as mesmas soluções para diferentes FME. Assim, cada fibra foi utilizada como seu próprio controle, exceto em alguns experimentos, que utilizaram outra fibra como controle.

2.3.1 Protocolo experimental

Com o objetivo de se avaliar a capacidade do RS em liberar íons cálcio, e o papel do eugenol e cafeína nesse mecanismo, bem como os efeitos de diferentes antagonistas na liberação de cálcio dos depósitos intracelulares, induzidos pela cafeína e pelo eugenol, as fibras foram submetidas aos seguintes protocolos.

Inicialmente a fibra foi mantida na solução relaxante (solução R), por alguns minutos e a seguir a mesma foi transferida para a solução E a qual apresentava baixa concentração de EGTA (0,5 mM). A imersão da fibra nessa solução teve como finalidade reduzir a capacidade de tamponamento de íons cálcio no interior das miofibrilas.

A seguir a fibra foi transferida para a solução A (solução que induz força máxima, vide tabela 2). Após esse procedimento, cada fibra foi transferida para a solução R, na qual permaneceu por 30 segundos, sendo então transferidas para a solução E.

Na seqüência, a fibra foi transferida para a solução C (solução de carregamento), com a finalidade de se carregar o RS com íons cálcio, mantendo-

se a fibra nessa solução por 2 minutos, tempo suficiente para promover o carregamento total do retículo sarcoplasmático (NOSEK *et al.*, 1997).

A seguir a fibra foi transferida e mantida por 30 segundo na solução E, que apresenta baixa concentração de EGTA. A imersão da fibra nesta solução teve como finalidade reduzir a capacidade de tamponamento de íons cálcio no interior das miofibrilas, o qual foi posteriormente liberado do retículo sarcoplasmático. A fibra foi então transferida para outra câmara contendo solução E na qual adicionou-se cafeína (10mM ou 30mM). Como nesta solução a capacidade de tamponamento dos íons cálcio é reduzida, isto permitiu que todo o cálcio liberado do retículo sarcoplasmático ativasse o sistema contrátil. A contração muscular assim obtida forneceu um índice apropriado da quantidade de cálcio liberada do retículo sarcoplasmático. (ENDO e LINO, 1980).

Após registrada a contração induzida pela cafeína, efetuou-se a retirada desse composto por meio da transferência da fibra para a solução relaxante (solução R). Idêntico protocolo foi utilizado para avaliar os efeitos do eugenol na liberação de íons cálcio do RS mediante sua adição na solução contendo baixa concentração de EGTA (Solução E).

Utilizando-se o mesmo protocolo experimental, os diferentes antagonistas, (Tetracaína 1mM , Rianodina 100 μ M, Vermelho de Rutênio 10 μ M , Neomicina 10 mM e Heparina 2,5 mg.ml⁻¹) , foram adicionados a solução E onde a fibra foi incubada por um período entre 15/60 minutos, dependendo do antagonista utilizado, antes de sua exposição a cafeína ou eugenol. Durante a exposição da fibra a cafeína ou eugenol esses diferentes antagonistas foram mantidos em solução.

A ativação máxima do sistema contrátil foi obtida transferindo-se a fibra muscular da solução R para a solução A, solução essa que induz força máxima de contração por apresentar 10^{-4} M de íons cálcio. Após o alcance do platô da força, o relaxamento muscular foi obtido quando a fibra foi novamente transferida para a solução R. A ativação máxima do sistema contrátil foi induzida no início e no final de cada experimento.

2.4 Preparação de fibra desmembranada pelo uso de Triton X 100

As fibras provenientes do músculo sartório de rã foram obtidas de forma semelhante ao descrito no item 2.3. Com objetivo de avaliar a capacidade de produção de força e a sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio, as fibras, previamente isoladas, foram permeabilizadas com emprego de Triton X 100. Para tal, adicionou-se à solução R (vide tabela 2), esse detergente não iônico em uma concentração final de 0,5% v/v. As fibras permaneceram imersas nessa solução por um período de 30 minutos.

A essa solução adicionou-se fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 mM e benzamidina 1 mM, que atuam como bloqueadores enzimáticos, prevenindo assim a proteólise do sistema contrátil. A utilização do Triton X 100 tem por finalidade promover a solubilização do sarcolema e de todas as estruturas intracelulares constituídas de membrana. O sistema contrátil das fibras assim permeabilizadas é mantido íntegro estrutural e funcionalmente. A montagem da fibra no sistema para a medida de força foi a mesma descrita no item 2.3. A ativação do sistema contrátil foi realizado mediante a exposição da fibra às soluções contendo concentrações crescentes de íon cálcio.

Todos os dados de força contrátil isométrica foram normalizados para aqueles obtidos durante a ativação máxima da preparação, quando a fibra foi exposta a solução com pCa 4.0 (solução A).

A avaliação da sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio foi determinada na presença e ausência de eugenol (5 mM). Experimentos com heparina ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), foram realizados objetivando avaliar a sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio na presença e ausência dessa substância, pois estudos preliminares demonstraram que a heparina apresenta efeitos inibitórios sobre o aparato contrátil da fibra muscular esquelética de murinos (TALON *et al.*, 1997).

Os níveis de tensão máxima foram obtidos com pCa entre 5.0 e 4.0. Os níveis de força obtidos com as concentrações de íons cálcio insuficientes para se fazer a ativação máxima da preparação, foram normalizados para aqueles obtidos

durante a ativação máxima. Os resultados de força versus concentração de íons cálcio foram ajustados na equação de Hill, por meio da expressão não linear dos mínimos quadrados:

$$\%F_{\text{máx}} = 100 [\text{Ca}^{2+}]^N / [(\text{Ca}^{2+}_{50})^N + (\text{Ca}^{2+})^N],$$

Nessa equação, N é uma constante relacionada com a inclinação da curva força/concentração de íons cálcio e Ca^{2+}_{50} é a concentração de cálcio necessária para se obter 50% da força contrátil máxima da preparação. Para evitar o mascaramento das possíveis diferenças entre os grupos experimentais, os valores de N e de Ca^{2+}_{50} foram determinados para cada fibra em cada situação experimental. A partir desses valores, calculou-se a média e o desvio padrão para cada situação experimental.

2.5 Soluções

As soluções empregadas para a realização dos experimentos com músculo intacto estão descritas na Tabela 1, sendo que a solução com alta concentração de KCl foi obtida por modificando-se da solução de Ringer pela substituição isosmótica de NaCl por KCl. As soluções contendo eugenol, cafeína, ou nifedipina foram preparadas pela adição da substância pura diretamente à solução. A procaína, tetracaína, rianodina, heparina ou dantrolene, foram adicionadas às soluções, a partir de soluções estoques preparadas em Ringer Normal, no dia de sua utilização.

A composição das soluções utilizadas nos experimentos realizados com fibra isolada foi calculada empregando-se um programa de computador escrito na linguagem Turbo Pascal que descreve as múltiplas constantes de equilíbrio de íons em solução, usando constantes de associação previamente publicadas (GODT e LINDLEY, 1982). As Tabelas 2 e 3 demonstram a composição das soluções empregadas neste estudo.

Tabela 1: Composição das soluções utilizadas em preparações com músculo intacto isolado de anfíbio. Concentrações estão expressas em mM .

	Ringer Normal	Ringer 100	Ringer 0 Ca^{2+}
Na^+	110	14	110
K^+	4	100	4
Mg^{2+}	2	2	2
Ca^{2+}	2	2	-
Cl^-	122	122	122
TRIS	10	10	10
EGTA	-	-	1

Temperatura : 22 ° C pH : 7.4

Tabela 2. Composição das soluções (mM), calculada pelo programa MS and BES (turbo 87 versão 3.0), utilizadas para os protocolos experimentais realizados com fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina ou Triton X 100

	Solução A	Solução R	Solução C	Solução E
Mg ²⁺	1	1	1	0,1
MgATP	2	2	2	2
Fosfocreatina	15	15	15	15
EGTA	5	5	5	0,5
BES	50	50	50	50
pCa (-log[Ca ²⁺])	4,0	8,5	6,4	8,5
Creatina kinase*	0,25	0,25	0,25	0,25
Força iônica	200	200	200	200
pH	7	7	7	7

As concentrações estão expressas em mM, exceto quando indicado.

A força iônica das soluções foi ajustada com metanosulfonato de potássio (KMSO₃).

* mg/ml

Tabela 3: Representação dos volumes de mistura de soluções pCa 7,0 e pCa 5,0 (em ml), empregada para o preparo das soluções de pCa^{2+} de 6,6 a 5,2 utilizadas em experimentos de fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por Triton X 100:

pCa	pCa5.0 (ml)	pCa7.0 (ml)
6.6	5.95452	19.04548
6.4	9.618036	15.38197
6.2	13.31538	11.68462
6.0	16.68228	8.317721
5.8	19.47415	5.525851
5.6	21.61814	3.381858
5.4	23.17084	1.829157
5.2	24.25455	0.745454

2.6 Reagentes Químicos

Todos os sais e substâncias empregados neste trabalho, foram obtidos da Sigma Chemical Co. (EGTA, Fluoreto de fenilmetilsulfonil, benzamidina, tetracaína, procaína, vermelho de rutênio, fosfocreatina, saponina, ATP, glicerol, MgCl_2 , BES, CaCl_2 , eugenol, Triton X-100, cafeína e neomicina), Merck (ácido metanosulfônico e dantrolene sódico), Reagen (KOH, KCl, NaCl, NaOH e Tris), Laboratório Roche (Heparina em sua forma policatiônica) e Calbiochem-Novabiochem Co. (rianodina).

2.7 Análise estatística

Os resultados estão representados pela média $\pm$ erro padrão médio obtidos em pelo menos 6 observações experimentais ($n \bullet 6$). Significância estatística foi aceita quando a probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade foi menor ou igual a 0.5% ($p \bullet 0,05$) pelo uso do teste t de Student.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito do eugenol (1, 3 e 10 mM) , em músculo sartório isolado de rã

O efeito do eugenol (1, 3 e 10 mM) na solução Ringer Normal está demonstrado da Figura 13. Como pode ser verificado, o eugenol, em concentrações superiores a 3 mM , foi capaz de induzir contração por si só. O encurtamento produzido por eugenol 10 mM foi de $227,5 \pm 39,92\%$ do obtido com solução 100 mM de K^+ ($n = 8$) . Após a contração ter atingido o estado estacionário a remoção do eugenol não provocou o relaxamento da preparação e a contração manteve-se por mais de doze horas.

3.2 Efeito do eugenol (10 mM) em músculo sartório isolado de rã e resposta contrátil na presença de íon K^+ na concentração de 100 mM

O efeito do eugenol (10 mM) na solução de Ringer Normal ou 100 mM de íon K^+ está demonstrado na Figura 14. Como pode ser observado, o eugenol nessa concentração foi capaz de induzir contração muscular. O encurtamento muscular produzido pelo eugenol em solução de Ringer Normal foi de $138,01 \pm 9,90\%$ ($n=6$) e em solução contendo 100 mM de íon K^+ foi de $148,42 \pm 18,0\%$ ($n= 6$), do obtido pela contração induzida por 100 mM de K^+ . Após a contração ter atingido o estado estacionário essa se manteve por mais de doze horas mesmo após a manutenção do músculo em solução Ringer Normal e na ausência de eugenol.

Figura 13- Efeitos do eugenol (1, 3 e 10 mM) em músculo sartório isolado de rã. Em **A**: Registro original de um experimento típico, mostrando primeiramente a contração induzida por 100 mM de K^+ e posteriormente, a curva-dose efeito do eugenol indicando a contração sustentada quando o músculo foi exposto a concentração final de 10mM. Os símbolos ( _{R4}) e ( _{R100}) indicam o momento em que a preparação foi exposta às solução de Ringer Normal (4 mM de K^+) e 100 mM de K^+ (Ringer 100). Calibração: a barra vertical indica o encurtamento (em centímetros), e a horizontal, o tempo (em segundos) Em **B**: Representação gráfica do encurtamento promovido pelo eugenol (1, 3 e 10 mM) em preparações mantidas em 4 mM de K^+ . Os dados foram normalizados para aqueles valores de encurtamento obtidos quando o músculo foi exposto à solução externa contendo 100 mM de K^+ , e estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

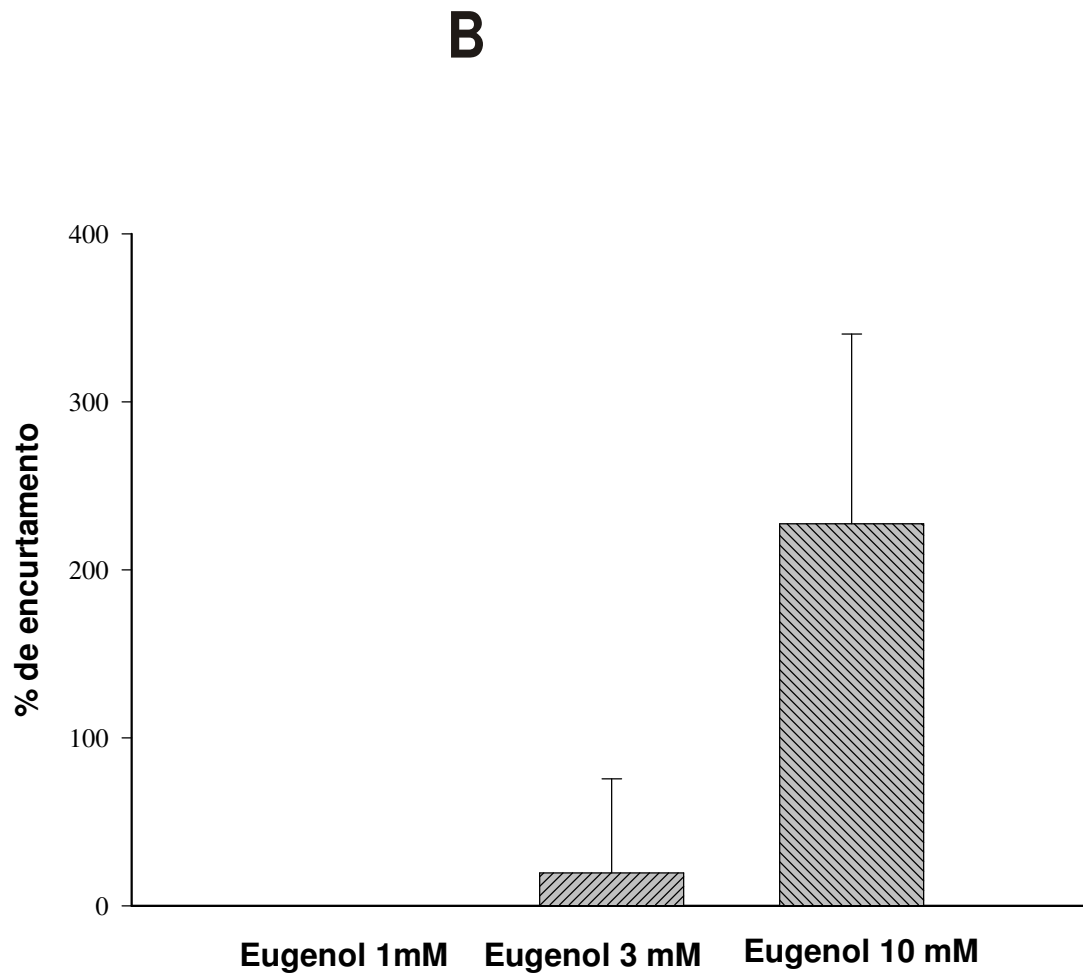
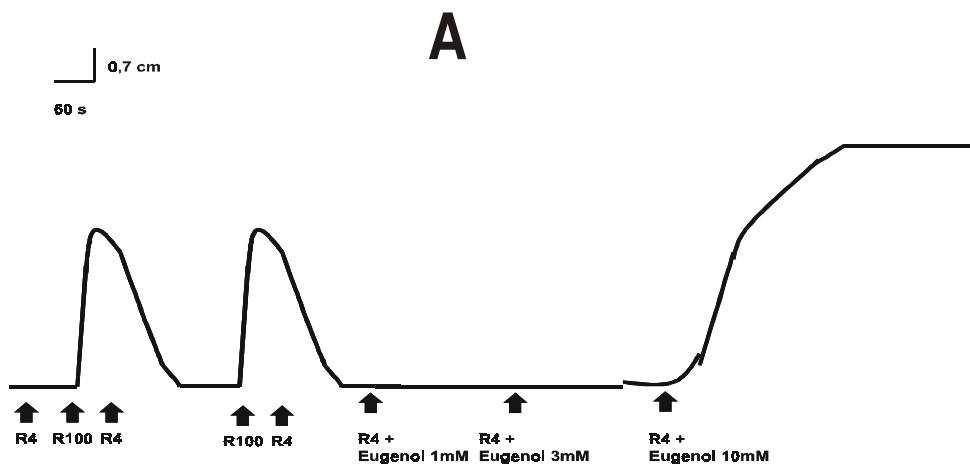
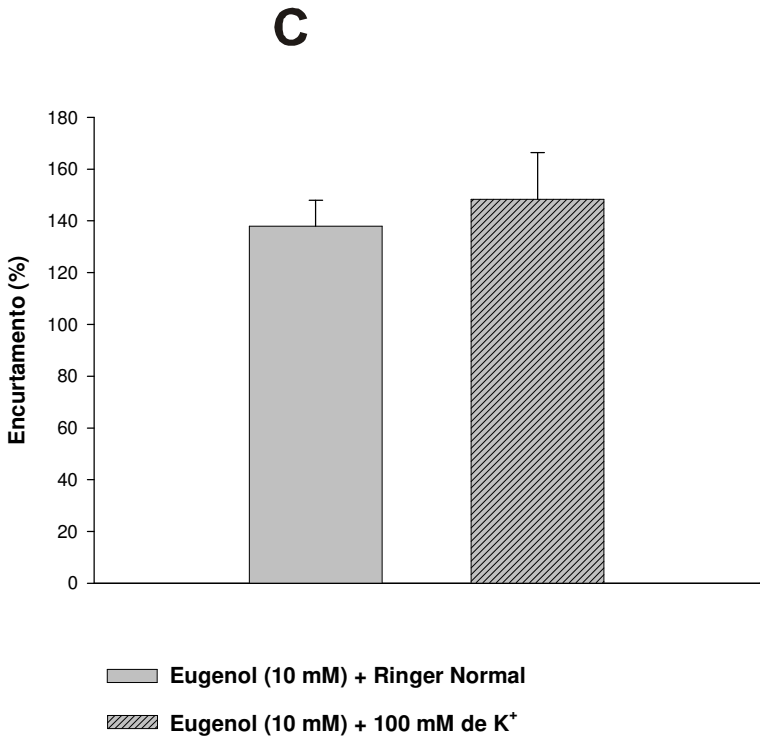
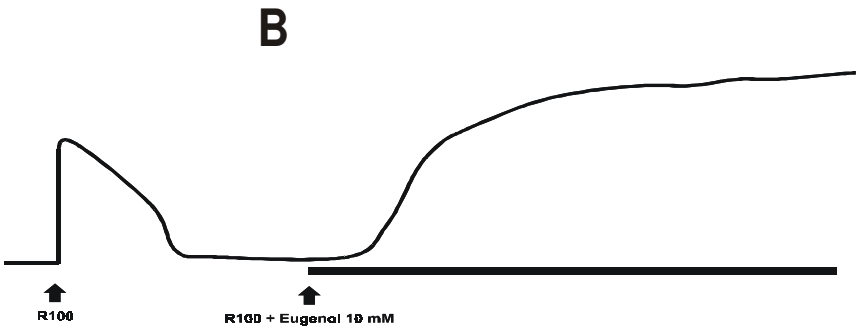
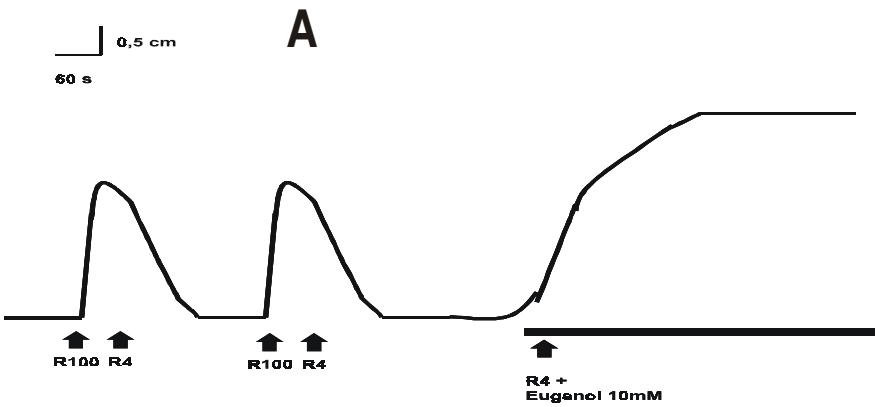


Figura 14- Efeito do eugenol (10 mM) em músculo sartório isolado de rã e resposta contrátil na presença do íon K^+ na concentração de 100 mM. Em **A**: Registro original de um experimento típico, mostrando inicialmente a contração induzida pela exposição do músculo a solução contendo 100 mM de K^+ e, posteriormente, a contração sustentada promovida pela exposição da preparação ao eugenol (10 mM) em solução 4 mM de K^+ . Em **B**: Após a contração muscular induzida por 100 mM de K^+ , a preparação foi mantida nessa solução, à qual adicionou-se 10 mM de eugenol. A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve submetida ao eugenol (10 mM) exposta ao eugenol 10 mM. Os símbolos ($\uparrow_{R4}$) e ($\uparrow_{R100}$) indicam, respectivamente, momento em que a preparação foi submetida a solução contendo 4 mM de K^+ (Ringer normal) e a solução contendo 100 mM de K^+ (Ringer 100). Calibração: a barra vertical indica o encurtamento (em centímetros) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **C**: Representação gráfica do encurtamento muscular promovido pelo eugenol (10 mM) em preparações mantidas em solução Ringer 4 ou 100 mM de K^+ . Os valores experimentais de encurtamento foram normalizados para os obtidos nas condições controle (100 mM de K^+) e estão representados como média $\pm$ erro padrão da média.



3.3 Efeito do eugenol (1, 3 e 6 mM), em músculo peitoral abdominal de rã

De acordo com a Figura 15, verifica-se que o eugenol em solução de Ringer Normal foi capaz de induzir contração do músculo peitoral abdominal quando presente em concentrações acima de 3 mM. Os valores de força muscular (em percentual daquela observada quando o feixe foi exposto a solução contendo 100 mM de K^+) obtidos foram de 0,0 , $63,67 \pm 29,21$ e $534,00 \pm 61,18$ para as concentrações de 1, 3 e 6 mM de eugenol ($n= 6$), respectivamente.

3.4 Efeito do eugenol (10mM), em músculo peitoral abdominal de rã.

O Efeito do eugenol (10mM) em preparação de músculo peitoral abdominal mantido em solução de Ringer Normal está representado na Figura 16. Nessa concentração o eugenol foi capaz de induzir contração, que alcançou $262,22 \pm 62,58$ % ($n = 6$) da contração obtida com 100 mM de K^+ .

3.5 Efeitos da nifedipina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e da remoção do íon cálcio extracelular na contração induzida pelo eugenol (10mM), em músculo sartório de rã.

Os resultados de encurtamento muscular promovido pelo eugenol na presença de nifedipina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e na ausência de cálcio externo estão representados na Figura 17. Os dados de encurtamento foram normalizados como descrito anteriormente. A remoção do cálcio extracelular e a adição de EGTA e de nifedipina não impediram que o eugenol ocasionasse o encurtamento de preparações de músculo sartório isolado de rã. Por outro lado, verificou-se que a nifedipina bloqueou a contração induzida por despolarização (100 mM de K^+). O encurtamento promovido pelo eugenol (10 mM), presente em solução de Ringer Normal , na ausência de cálcio externo e após incubação com nifedipina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) , foi de $168,75 \pm 48,75$ % em relação ao controle ($n= 6$). Após a contração

ter alcançado o estado estacionário, a remoção do eugenol não ocasionou o relaxamento das preparações. Com efeito, estas contrações mantiveram-se por mais de 12 horas.

3.6 Efeitos da procaína na contração induzida pela cafeína (10 mM) ou eugenol (1, 3 e 10 mM) em músculo sartório de rã

Os efeitos do eugenol (1, 3 e 10 mM) e da cafeína (10mM) em músculo intacto mantido em solução de Ringer Normal após incubação com procaína (10mM) por um período de 30 minutos estão demonstrados na Figura 18. Como pode ser verificado a procaína aboliu totalmente o encurtamento induzido pela exposição do músculo a cafeína (10 mM), mas não determinou bloqueio da contração induzida pelo eugenol. Os valores médios de encurtamento muscular, obtidos com 1, 3 e 10 mM de eugenol em relação aquele obtido com 100 mM de K^+ foram , respectivamente, de $4,93 \pm 3,61\%$, $101,27 \pm 39,76\%$ e $309,45 \pm 56,06\%$ (n=6).

Figura 15- Efeito do eugenol (1, 3 e 6 mM) em músculo peitoral abdominal de rã.. Em **A**: registro original de um experimento típico demonstrado, inicialmente , a contração induzida em feixes de fibras intactas de músculo cutâneo peitoral quando submetidos à solução contendo 100 mM de K^+ , e posteriormente, as contrações induzidas por concentrações crescentes de eugenol em solução de Ringer Normal . Os símbolos ( _{R4}) e ( _{R100}) indicam, respectivamente, quando os feixes de fibras intactas foram expostos às soluções de Ringer normal e 100 mM de K^+ (Ringer 100). Calibração : a barra vertical indica a força muscular desenvolvida (em mg) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **B**: representação gráfica dos valores de força de contração muscular expressos em porcentagem da força muscular obtidas quando os feixes foram expostos à solução de Ringer 100. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

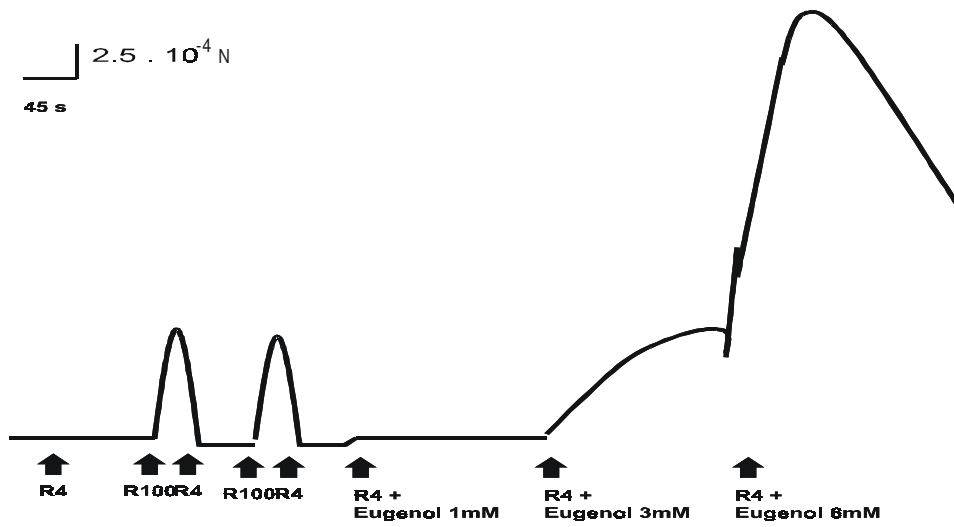
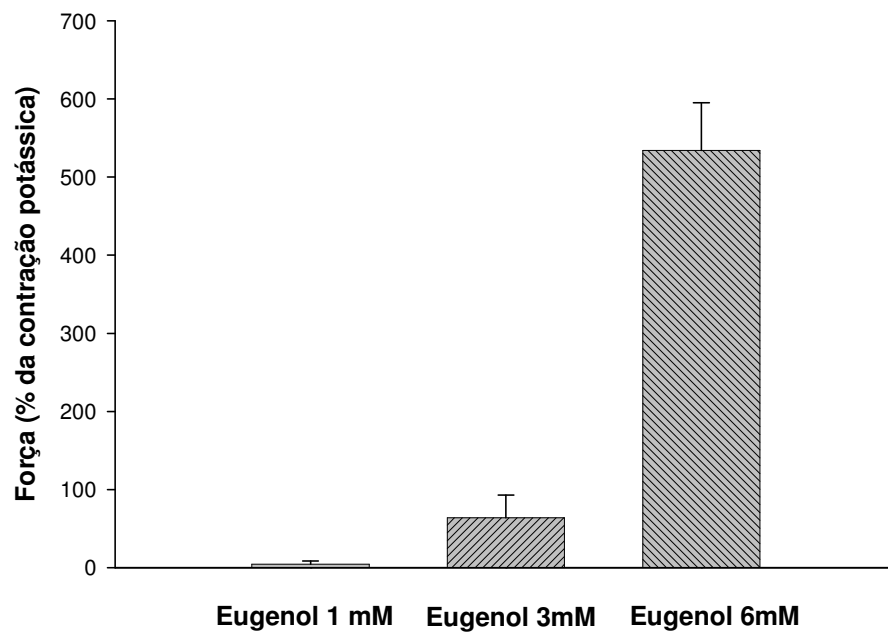
A**B**

Figura 16- Efeito do eugenol (10 mM) em músculo peitoral abdominal de rã. Em **A** : Registro original de um experimento típico, mostrando ,primeiramente, a contração promovida pela exposição dos feixes musculares intactos submetidos à solução contendo 100 mM de K^+ e, posteriormente, a contração sustentada quando os feixes musculares intactos foram expostos à solução de Ringer Normal na presença de eugenol (10 mM). A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta à solução de Ringer Normal na presença de eugenol (10 mM). Os símbolos ( _{R4}) e ( _{R100}) indicam, respectivamente, quando os feixes de fibras intactas foram expostos à solução de Ringer Normal e 100 mM de K^+ (Ringer 100). Calibração: a barra vertical indica a força muscular desenvolvida (em mg) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **B**: representação gráfica dos valores de força de contração muscular expressos em porcentagem da força muscular obtida quando os feixes foram expostos à solução de Ringer 100. Os valores estão expressos como média $\pm$ o erro padrão da média.

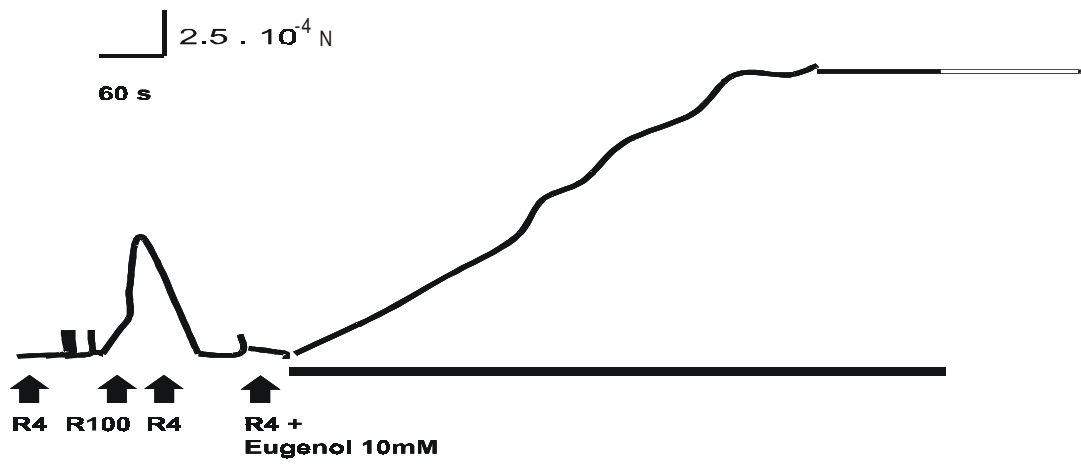
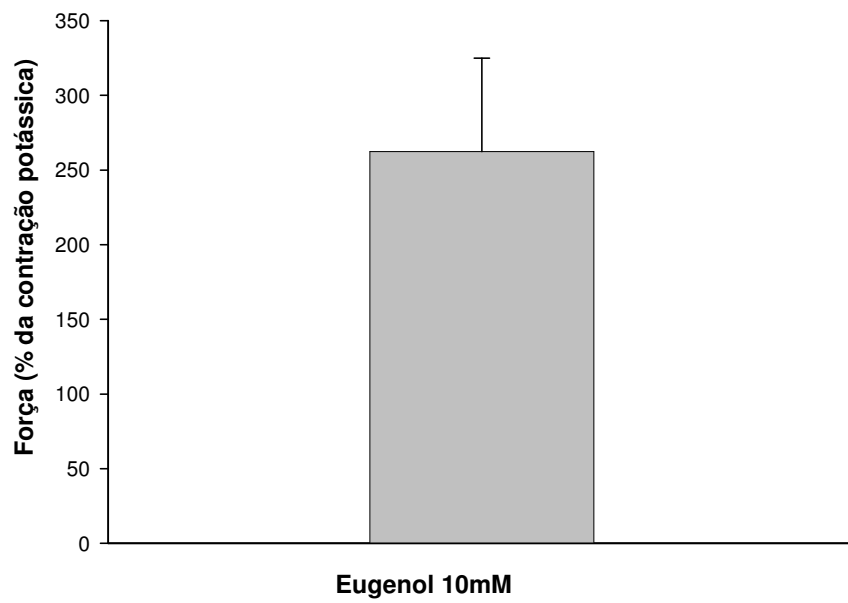
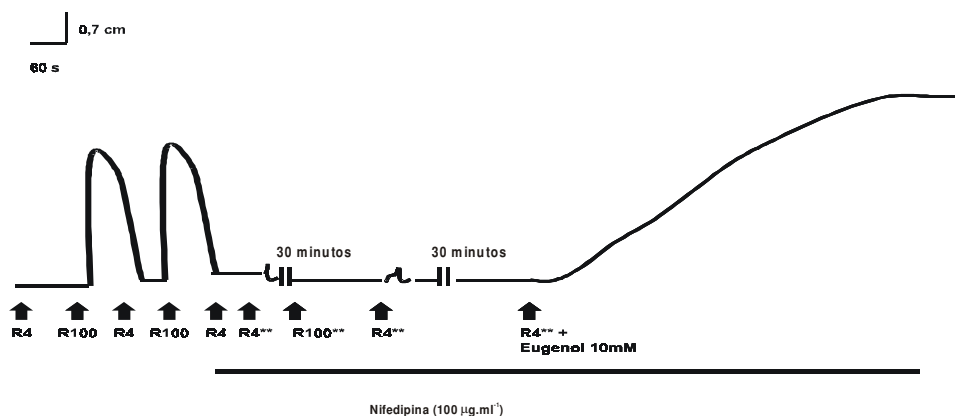
A**B**

Figura 17- - Avaliação dos efeitos da nifedipina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e da remoção do íon cálcio extracelular na contração induzida pelo eugenol (10 mM), em músculo sartório de rã. Em **A** : Registro original de um experimento típico demonstrando a contração promovida pela exposição do músculo à solução contendo 100 mM de K^+ . Após ativação e relaxamento iniciais, o músculo foi mantido em solução de Ringer Normal com adição de EGTA (1 mM) e remoção do cálcio externo . A essa solução foi adicionado nifedipina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e realizando incubação do músculo, por 30 minutos. A seguir, promoveu-se nova exposição do músculo à solução contendo 100 mM de K^+ na ausência de íons cálcio com 1 mM de EGTA e na presença de nifedipina. Após retorno da preparação a solução zero cálcio nominal, adicionou-se eugenol a essa solução. A barra horizontal indica o período em que o músculo foi submetido a nifedipina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e a s duas barras . Os símbolos ( R_4) e ( R_{100}), indicam respectivamente solução de Ringer Normal e Ringer 100 mM de K^+ , enquanto que os símbolos ( R_4^{**}) e ( R_{100}^{**}), representam as soluções Ringer zero cálcio nominal contendo 4 mM de K^+ e Ringer zero cálcio nominal contendo 100 mM de K^+ . As soluções zero cálcio nominal foram obtidas pela adição de 1 mM de EGTA e retirada de Ca^{2+} . A barra vertical indica o encurtamento (em centímetros) e a horizontal o tempo (em segundos). Em **B**: Representação gráfica do valor médio dos dados obtidos em **A**, para eugenol, em porcentagem de encurtamento em relação ao valor médio dos resultados obtidos com $[\text{K}^+] = 100 \text{ mM}$. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão médio.

A



B

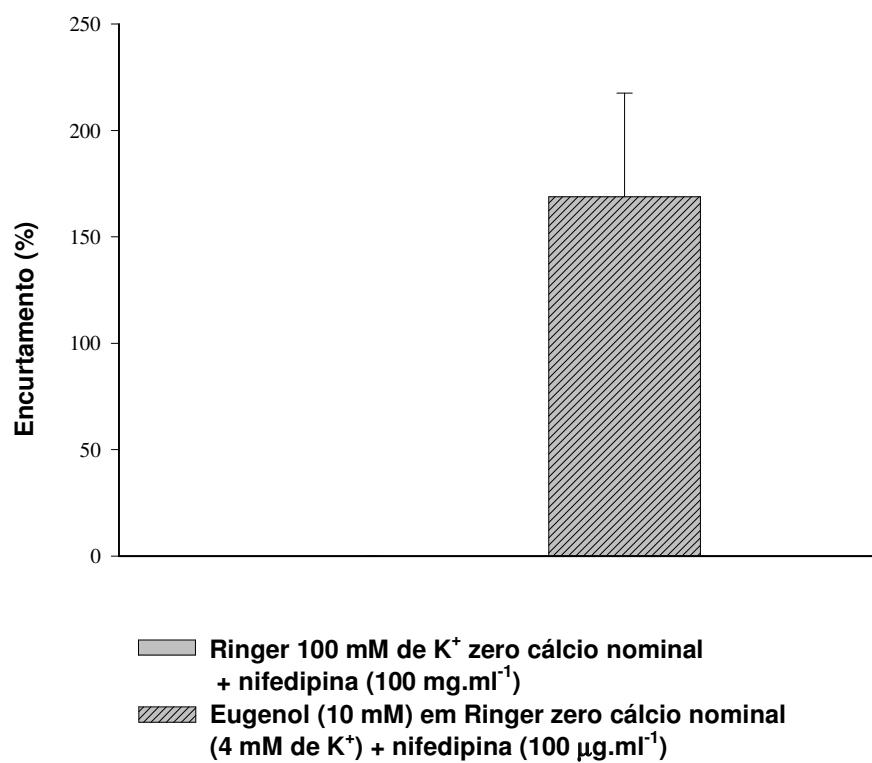
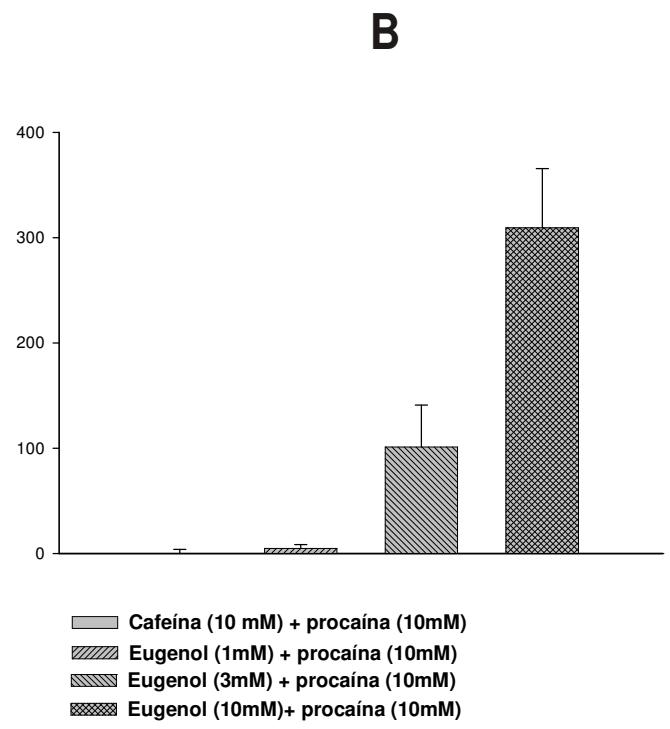
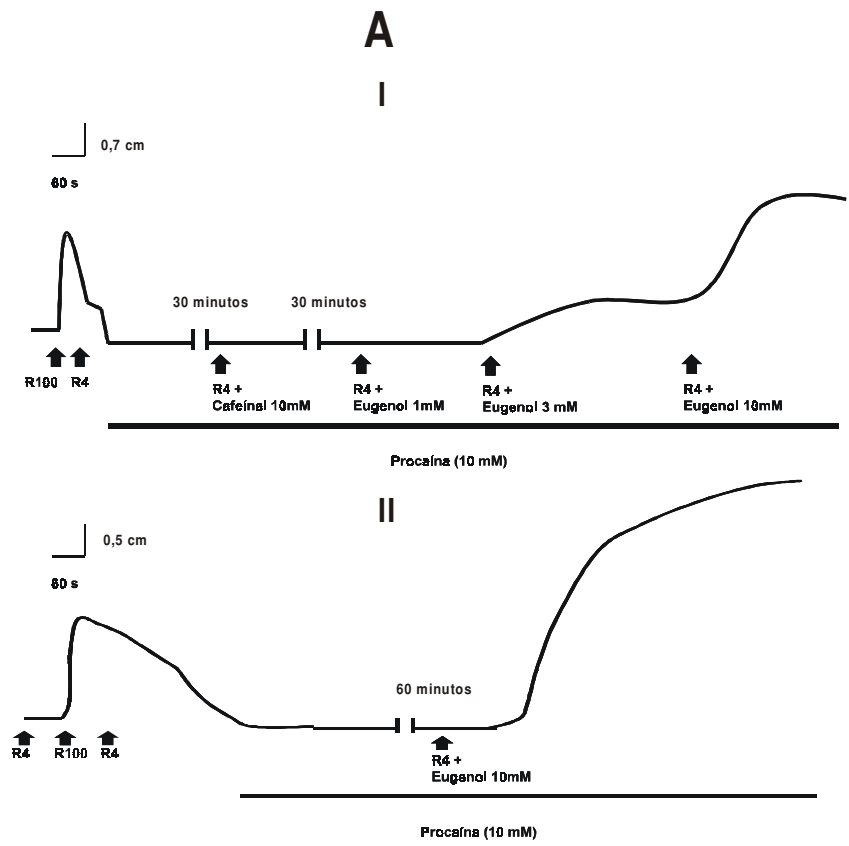


Figura 18- Efeitos da cafeína (10 mM) e do eugenol (1, 3 e 10 mM), em músculo sartório de rã após incubação com procaína (10 mM). Em **A**: Registro original de um experimento típico, demonstrando, inicialmente, a contração promovida pela exposição do músculo à solução contendo 100 mM de K^+ , e na seqüência, incubação com procaína (10 mM) em solução de Ringer Normal por 30 minutos. Na seqüência é mostrado o bloqueio da contração promovida pela exposição do músculo à solução de Ringer Normal contendo procaína. Como pode ser observado a incubação com procaína (10 mM) não suprimiu as contrações promovidas pelo eugenol (3 e 10 mM). A ausência de bloqueio da procaína na contração induzida pelo eugenol foi observada, também, quando as preparações foram, previamente, incubadas com procaína por 60 minutos. Nesse conjunto de experimentos a procaína bloqueou totalmente a contração induzida pela cafeína. A barra horizontal indica o período em que a preparação esteve exposta a procaína (10 mM) e as duas barras verticais menores (**II**), tempo de incubação. Os símbolos ( **R4**) e ( **R100**) indicam o momento em que a preparação foi exposta à solução de Ringer Normal e o momento em que a preparação foi submetida à solução contendo 100 mM de K^+ (Ringer 100). Calibração: a barra vertical indica o encurtamento (em centímetros) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **B**: Representação gráfica dos dados obtidos para cafeína (10 mM) e eugenol (1, 3 e 10 mM) conforme protocolo demonstrado em A. Os dados obtidos foram normalizados para aqueles resultantes da exposição do músculo à solução contendo 100 mM de K^+ e estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.



3.7 Efeitos da tetracaína (10 mM), na contração induzida pela cafeína (10 mM) e pelo eugenol (10mM) em músculo sartório de rã

Os resultados de encurtamento muscular promovido pela cafeína (10mM) e pelo eugenol (10mM), após incubação das preparações com tetracaína (10mM), estão representados na Figura 19. Os valores de encurtamento muscular estão normalizados para aqueles observados quando o músculo foi exposto a solução de Ringer contendo 100 mM de K^+ . Como pode ser observado a incubação do músculo em soluções de Ringer Normal contendo tetracaína (10 mM), por 30 minutos, promoveu completo bloqueio da contrações induzidas pela exposição do músculo a solução Ringer contendo 100 mM de K^+ e ou cafeína. Nessa mesma preparação a tetracaína não bloqueou a contração induzida pelo eugenol (10 mM), cujo valor de encurtamento foi de $158,53 \pm 26,54$ % em relação ao controle (n=6). Em algumas preparações, após a contração induzida pelo eugenol (10 mM) ter alcançado o estado estacionário, a lavagem da preparação, por diversas vezes, com solução de Ringer Normal promoveu relaxamento das peças musculares.

3.8 Efeito da tetracaína (10 e 20 mM), na contração induzida por eugenol (10mM) em músculo sartório de rã

Os resultados de encurtamento promovido pelo eugenol (10 mM) após incubação das preparações com tetracaína (10 e 20 mM), estão representados na Figura 20. Nessa Figura (em B) os níveis de encurtamento estão normalizados para os valores obtidos quando o músculo foi exposto a solução de Ringer 100 mM de K^+ . Como pode ser observado, após incubação por 30 minutos com tetracaína (10 mM), houve bloqueio da contração promovida pelo aumento da concentração de K^+ externo (exposição a solução Ringer 100 mM de K^+), mas não houve bloqueio do encurtamento promovido pelo eugenol (10 mM). O encurtamento muscular promovido pelo eugenol (10 mM) na presença de

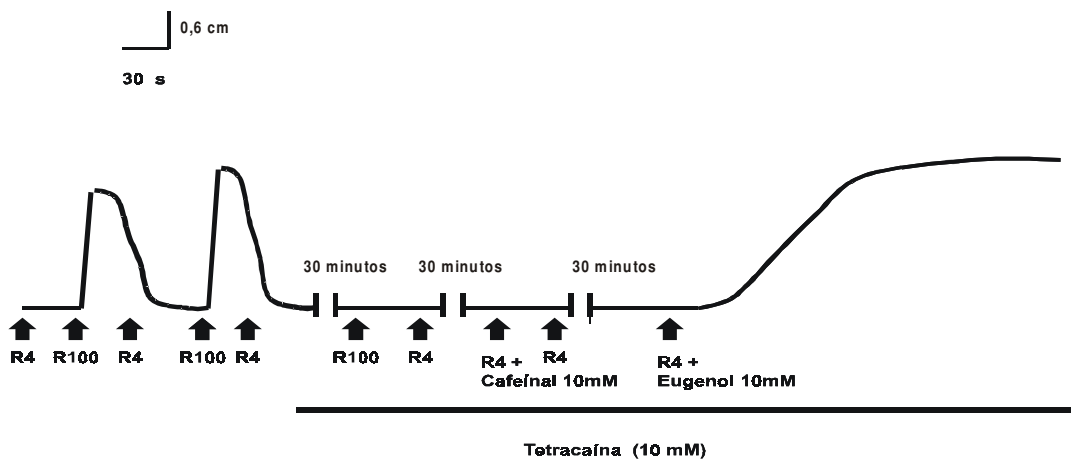
tetracaína 10 mM foi de $208,59 \pm 19,54$ % ($n = 6$) em relação ao controle. Nessas mesmas condições experimentais o aumento da concentração de tetracaína para 20 mM bloqueou a contração promovida pela despolarização do sarcolema com 100 mM de K^+ , mas foi ineficiente em bloquear a contração induzida pelo eugenol, a qual atingiu $70,05 \pm 19,58$ % da contração induzida por 100 mM de K^+ .

3.9 Efeito do eugenol (10mM) e da cafeína (10 mM) em solução de Ringer Normal em músculo peitoral abdominal intacto de rã após incubação com procaína (10 ou 30 mM)

Os resultados obtidos com eugenol (10 mM) e cafeína em músculo peitoral abdominal intacto de anfíbio após incubação com procaína (10 mM) estão representados na Figura 21. Os valores de força muscular foram normalizados para os obtidos quando o feixe de fibras foi exposto a solução contendo 100 mM de K^+ . Como pode ser observado a incubação prévia da preparação com procaína (10 mM), por 30 minutos, promoveu bloqueio das contrações induzidas pela exposição do feixe muscular a solução Ringer 100 mM de K^+ e a cafeína. Contudo, a procaína (10 mM) não determinou bloqueio da contração induzida pelo eugenol. O valor de força contrátil obtido para o eugenol foi de $299,11 \pm 13,39$ % em relação ao controle. Os resultados obtidos nessa preparação apresentaram semelhanças qualitativas ao verificado em músculo sartório. Ocorreu bloqueio completo da contração induzida pela cafeína após incubação com procaína e manutenção da contração induzida pelo eugenol após incubação com procaína. O aumento na concentração de procaína para 30 mM ainda assim não bloqueou a contração induzida pelo eugenol que alcançou $132,9 \pm 6,13$ % da contração promovida pela exposição do feixe de células a solução 100 mM de K^+ , na ausência desse anestésico.

Figura 19- Efeitos da tetracaína (10 mM), no encurtamento muscular induzido pela cafeína (10 mM) e pelo eugenol (10 mM) em músculo sartório de rã. Em **A**: Registro original de um protocolo típico, mostrando os efeitos da tetracaína nas contrações induzidas por potássio (100 mM), cafeína e eugenol. A prévia incubação da preparação com tetracaína, por 30 minutos, aboliu as respostas contráteis induzidas por $[K^+] = 100 \text{ mM}$ e por cafeína, mas não a causada pelo eugenol. A barra horizontal indica o tempo em que o músculo ficou exposto a tetracaína e as barras verticais menores o (**II**) o tempo de incubação de 30 minutos . Os símbolos ($\uparrow_{R4}$) e ($\uparrow_{R100}$) indicam o momento em que a preparação foi exposta à solução de Ringer Normal e à solução contendo 100 mM de K^+ , respectivamente (Ringer 100). Calibração: a barra vertical indica o encurtamento (em centímetros) e a horizontal, o tempo (em segundos). Os dados, em valores percentuais, foram normalizados para o encurtamento obtido quando o músculo foi submetido à solução de Ringer 100 mM de K^+ , e estão expressão como $\text{media} \pm \text{erro padrão da média}$.

A



B

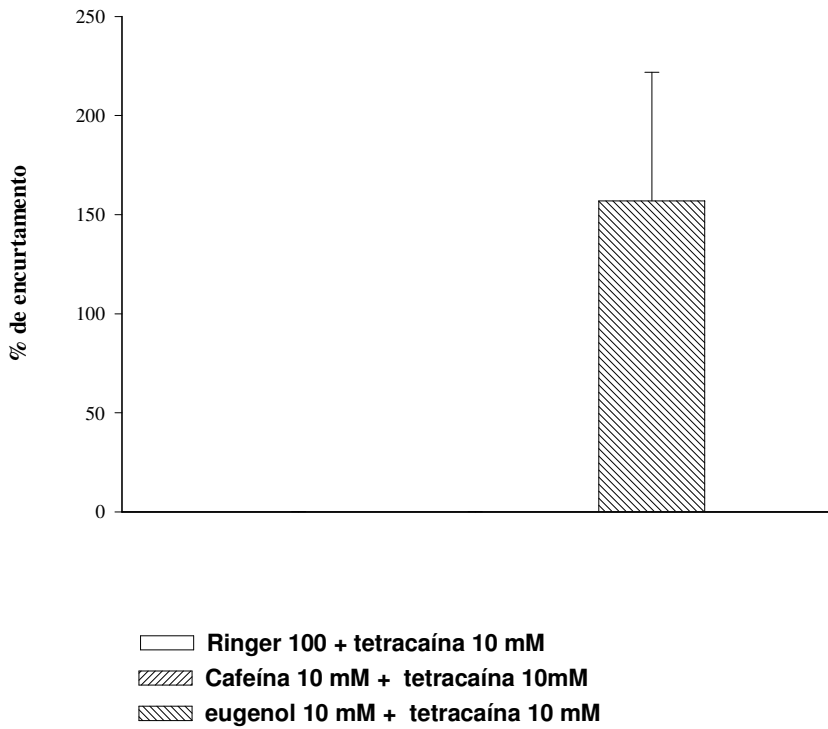


Figura 20- Efeito da tetracaína (10 e 20 mM), na contração induzida por eugenol (10 mM), em músculo sartório de rã. Em **A**: Registro original de um experimento típico, indicando a contração oriunda da exposição do músculo sartório à solução Ringer 100 mM de K^+ e, adicionalmente, incubação por 30 minutos com tetracaína (10 mM), em solução de Ringer Normal, com bloqueio da contração induzida por Ringer 100 mM de K^+ . A prévia incubação com tetracaína não aboliu a resposta contrátil induzida pelo eugenol (10 mM) em solução de Ringer Normal. Em **B**: Registro de um experimento típico, mostrando a contração promovida pela exposição do músculo à solução de Ringer 100 mM de K^+ e incubação com tetracaína (20 mM) por 30 minutos, com bloqueio da contração hipercalêmica. A seguir, incubação do músculo com tetracaína (20 mM) em Ringer Normal e adição de eugenol (10 mM). A barra horizontal indica o período em que o músculo ficou submetido a tetracaína (10 ou 20 mM) e as duas barras verticais menores (||) evidenciam o período de incubação. Os símbolos ( _{R4}) e ( _{R100}) indicam o momento em que a preparação foi exposta à solução de Ringer Normal (4 mM de K^+) e o momento em que a preparação foi submetida à solução contendo 100 mM de K^+ (Ringer 100). Calibração: A barra vertical representa o encurtamento (em centímetros) e a horizontal, o tempo (em segundos): Em **C**: Representação gráfica dos dados obtidos conforme os protocolos **A** e **B**. Os valores obtidos foram normalizados para aqueles oriundos da exposição das preparações à solução Ringer 100 mM de K^+ . Os dados estão expressos como a média $\pm$ o erro padrão da média.

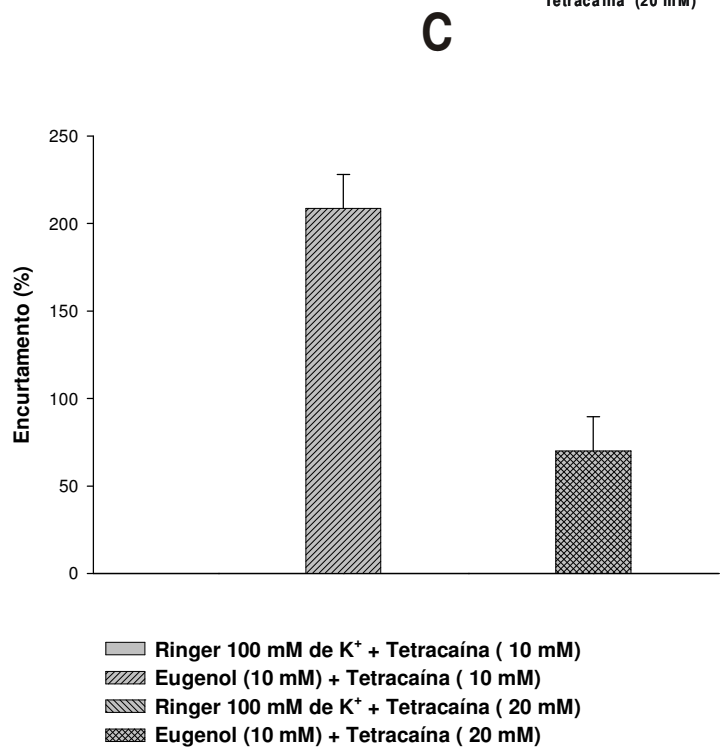
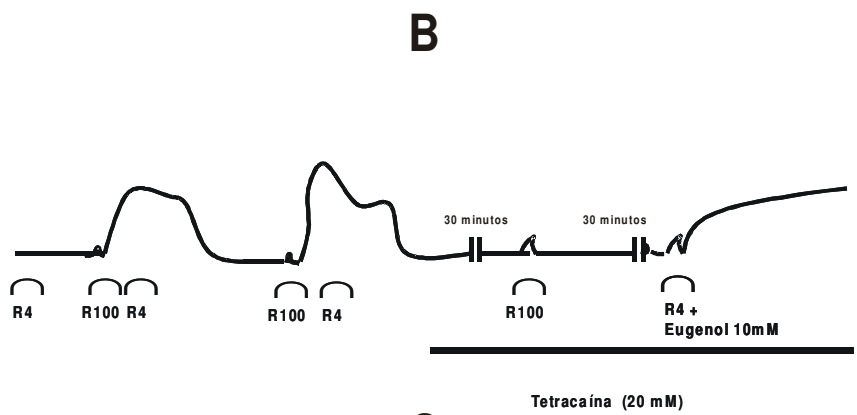
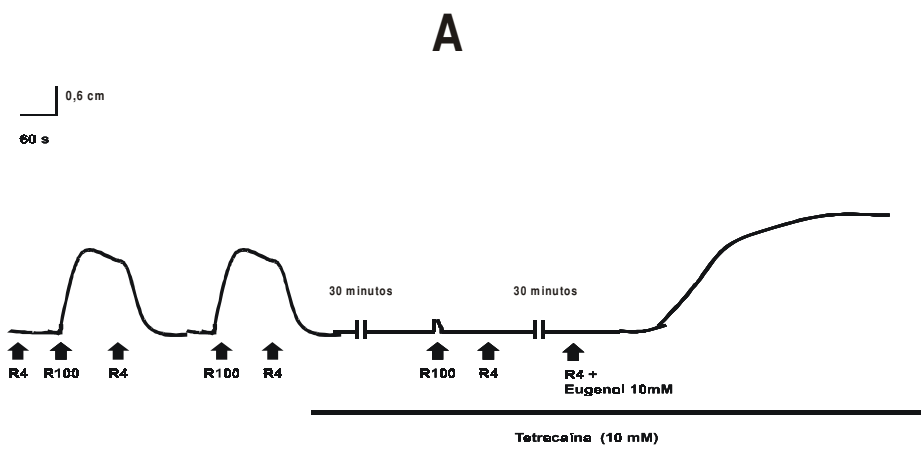
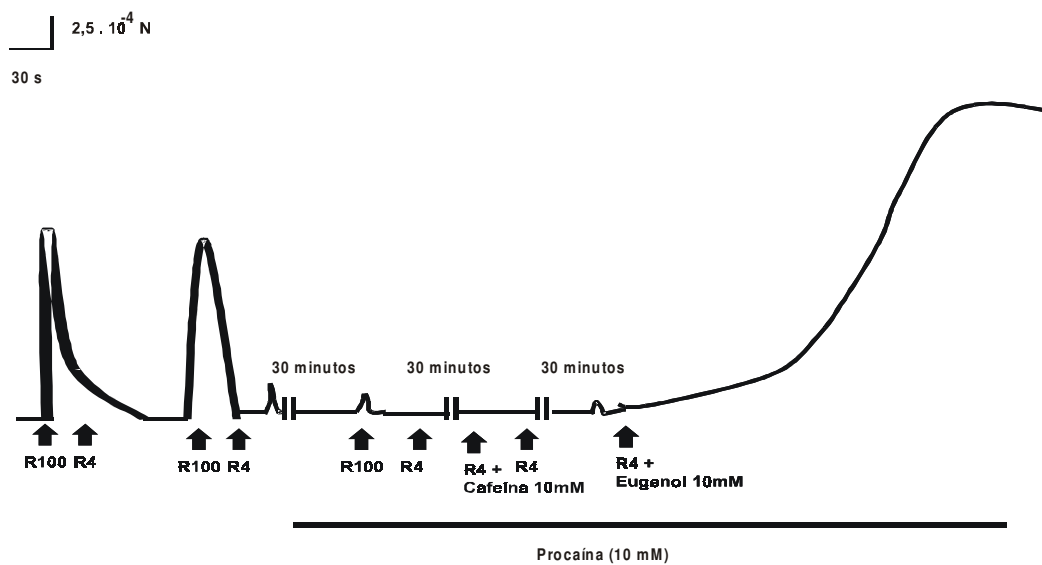
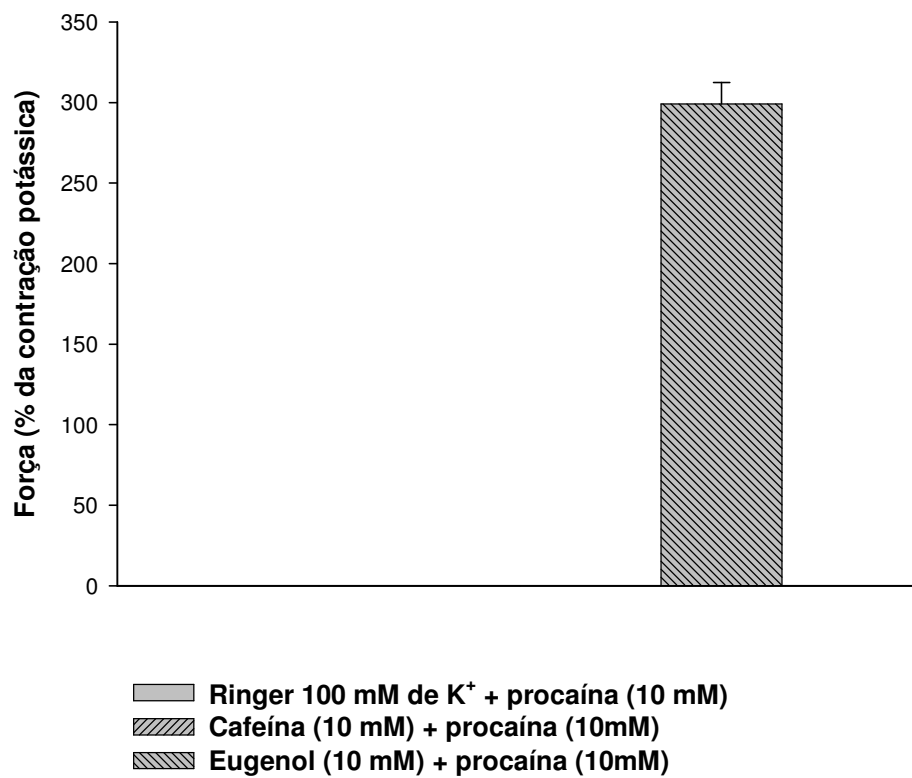


Figura 21- Análise do efeito da procaína (10 mM), na contração induzida pela cafeína (10 mM) e pelo eugenol (10 mM) em músculo peitoral abdominal de rã. Em **A**: Registro de um experimento típico demonstrando os efeitos da procaína nas contrações induzidas por 100 mM de K^+ , cafeína e eugenol. Antes dos testes com Ringer 100 mM de K^+ , cafeína ou eugenol, a preparação foi previamente incubada com procaína por 30 minutos. A procaína foi mantida nas soluções de Ringer 100 mM de K^+ e nas soluções de Ringer Normal contendo cafeína e eugenol. As barras verticais menores (||) presentes no registro, delimita o período de 30 minutos em que o polígrafo foi mantido desligado e a barra horizontal o período de tempo em que a preparação foi submetida a procaína (10 mM). Os símbolos ( _{R4}) e ( _{R100}) indicam, respectivamente, os momentos em que a preparação foi exposta à solução de Ringer Normal e à solução contendo 100 mM de K^+ (Ringer 100). Calibração : a barra vertical indica a força muscular desenvolvida (em mg) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **B**: Representação gráfica dos valores de força de contração muscular expressos em porcentagem da força muscular obtida quando os feixes foram expostos à solução de Ringer 100. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

A



B



3.10 Efeito da procaína (30 mM), na contração induzida pelo eugenol (1, 3 e 6 mM) em feixes de músculo peitoral abdominal de rã

Os resultados das medidas de força de contração induzidas pelo eugenol (1, 3 e 6 mM) após incubação com procaína (30 mM), em feixe intacto de músculo peitoral abdominal estão representados na Figura 22. Os valores de força muscular, em valores percentuais, foram normalizados para os obtidos quando o feixe de fibras foram exposto a solução contendo 100 mM de K^+ . Como poder ser observado a incubação com procaína (30 mM) , por 30 minutos, determinou bloqueio completo da contração hipercalcêmica, entretanto, não aboliu a contração promovida pelo eugenol (3 e 6 mM), cujos valores foram , respectivamente , de $3,49 \pm 2,26$ e $83,01 \pm 24,35$ % daqueles obtidos em 100 mM de K^+ (n= 7).

3.11 Efeitos da rianodina (100 μ M) na contração induzida pela cafeína (10 mM) e eugenol (10 mM), em músculo intacto peitoral abdominal de rã

Os efeitos da rianodina (100 μ M), na contração induzida pela cafeína (10 mM) e eugenol (10 mM) em feixes intactos de músculo peitoral abdominal, mantidos em solução de Ringer Normal estão representados na Figura 23. Os valores de força muscular foram normalizados para aqueles obtidos quando os feixes intactos foram submetidos à solução de Ringer contendo 100 mM de K^+ . A rianodina, em altas concentrações (10-300 μ M), apresenta efeito bloqueador da liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático e conseqüentemente da contração muscular, tanto em fibras intactas quanto quimicamente permeabilizadas (CORONADO *et al.*, 1994). Em células intactas, esse composto apresenta inicialmente um efeito indutor de contração antes de apresentar seu efeito bloqueador sobre a contração muscular (FRYER *et al.*, 1989). A rianodina (100 μ M) promoveu contração sustentada dos feixes intactos seguida de um lento processo de relaxamento. A contração e o relaxamento ocorreram em tempo aproximado de duas horas, antes de desenvolver seu efeito bloqueador. Após o

relaxamento, não foi observada contração dos feixes ao serem expostos à solução Ringer 100 mM de K^+ contendo rianodina (100 μM), cafeína ou eugenol presentes em solução de Ringer Normal contendo rianodina (100 μM) ($n= 6$). Esse efeito indutor de contração seguido de bloqueio também foi encontrado quando o feixe muscular foi exposto a solução de Ringer 100 mM de K^+ contendo rianodina e mantido nessa condição até completo relaxamento. Após esse procedimento o feixe foi transferido e mantido em solução de Ringer Normal, antes de ser submetido a solução de Ringer 100 mM de K^+ , à cafeína ou ao eugenol. Assim, a rianodina em células musculares intactas promoveu bloqueio tanto da contração hipercalêmica como daquelas induzidas pela cafeína e pelo eugenol presentes em solução de Ringer Normal ($n= 6$).

3.12 Efeitos do dantrolene (5 mg.ml⁻¹) na contração induzida pelo eugenol (6 mM) em músculo intacto peitoral abdominal de rã

Os resultados da medida de força de contração induzida pelo eugenol (6 mM), após incubação com dantrolene (5 mg.ml⁻¹), em feixe intacto de músculo peitoral abdominal estão representados na Figura 24. Os valores de força muscular foram normalizados para os obtidos quando o feixe de fibras foi exposto a solução contendo 100 mM de K^+ . Após incubação com dantrolene (5 mg.ml⁻¹), por 30 minutos, em Ringer Normal, verificou-se completo bloqueio da contração muscular quando as fibras foram expostas à solução Ringer 100 mM de K^+ contendo dantrolene (5 mg.ml⁻¹). A transferência dos feixes de fibras para a solução Ringer de Normal contendo dantrolene (5 mg.ml⁻¹), por um período adicional de 30 minutos, determinou bloqueio do efeito contrátil do eugenol, na concentração de 6 mM ($n= 12$). Devido a irreversibilidade do bloqueio da contração produzido pelo dantrolene, utilizou-se feixes de células, provenientes do mesmo músculo, para realização do controle. Para tal, os feixes de fibras musculares após terem sido expostos a solução de Ringer 100 mM de K^+ , foram transferidos para a câmara contendo solução de Ringer Normal, e ali mantidos por 60 minutos, antes de serem expostos ao eugenol 6 mM em Ringer Normal ($n = 9$).

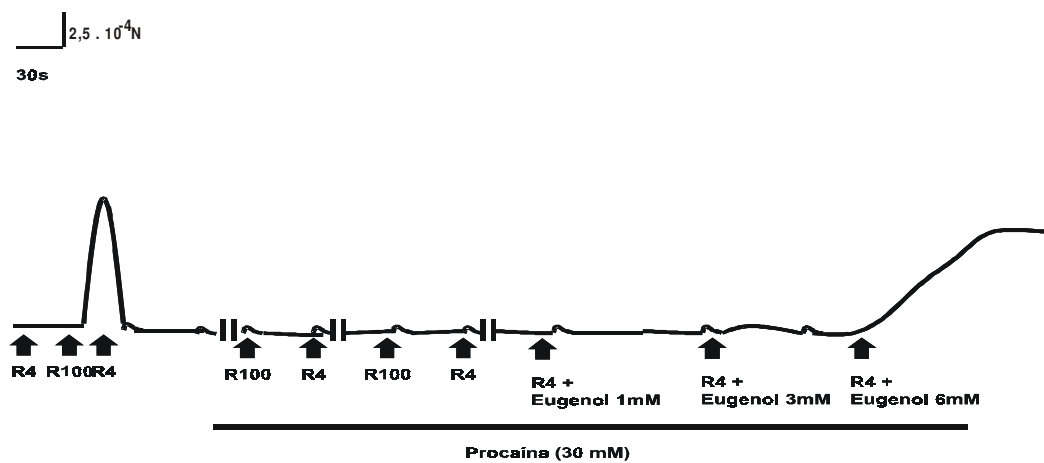
Os valores de força contrátil obtidos foram de $276,5850 \pm 50,7914$ em relação a contração promovida pela exposição do feixe de fibras à solução de Ringer 100 mM de K^+ .

3.13 Liberação de Ca^{2+} induzida pelo eugenol em fibras permeabilizadas por saponina

O eugenol induz contração em fibras musculares esqueléticas de anfíbios permeabilizadas por saponina que tiveram o retículo sarcoplasmático (RS) previamente carregado com íons Ca^{2+} . As fibras, após o carregamento do RS com cálcio, quando expostas a solução E, na presença de cafeína (30 mM) ou eugenol (5 mM), desenvolveram contrações, aproximadamente, de mesma amplitude às observadas pela ativação máxima do sistema contrátil com íon cálcio (Fig 25 A). Nesses experimentos, a média da amplitude das contrações induzidas por eugenol (5 mM), em fibras esqueléticas permeabilizadas foi de $94,4 \pm 19,1\%$ ($n = 12$), daquelas obtidas pela ativação máxima do sistema contrátil (induzida com pCa 4,0). Nas mesmas fibras foi testada também cafeína (30 mM), por ser uma substância capaz de induzir a liberação de cálcio através dos canais de cálcio (RyR) presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (KLEIN *et al*, 1992). Com o emprego de 30 mM de cafeína presente na solução E, a força desenvolvida foi de $81,2 \pm 19,1\%$ da $F_{máx.}$ (pCa 4,0). Após a contração induzida por eugenol (5 ou 10 mM), a maioria das fibras não foi capaz de responder a um novo ciclo de carregamento do RS e posterior liberação de Ca^{2+} com cafeína, mas todas as fibras apresentaram ativação máxima em solução pCa 4,0 (solução A). Quando a concentração de eugenol foi diminuída para 2 mM, todas as fibras foram capazes de responder com liberação de Ca^{2+} quando expostas a solução E contendo cafeína 30 mM ($n = 4$), demonstrando a manutenção das propriedades funcionais do RS após exposição ao eugenol (Figura 25). Verificamos, portanto, que o eugenol (2, 5 e 10 mM) provoca contração em fibras musculares esqueléticas permeabilizadas com saponina. Esses efeitos estão ilustrados na curva concentração-resposta mostrada na Figura 25C.

Figura 22- Efeito da procaína (30 mM) na contração induzida pelo eugenol (1, 3 e 6 mM), em feixes de músculo peitoral abdominal de rã. Em **A**: Registro original de um experimento típico, demonstrando a contração promovida pela exposição dos feixes à solução de Ringer 100 mM de K^+ e posteriormente, incubação, por 30 minutos, com procaína (30 mM) em solução de Ringer Normal. A seguir os feixes foram submetidos a solução de Ringer 100 mM de K^+ na presença de procaína (30 mM) e após incubação adicional, por 30 minutos, em solução de Ringer Normal. Na presença de procaína (30 mM), realizou-se a curva dose-efeito do eugenol (1, 3 e 6 mM). As barras verticais menores (II), presentes no registro indicam o tempo de incubação de 30 minutos e a barra horizontal o tempo em que os feixes musculares ficaram expostos à procaína (30 mM). Os símbolos () e () indicam, respectivamente, os momentos em que as preparações foram expostas à solução de Ringer Normal e à solução contendo 100 mM de K^+ (Ringer 100). Calibração: a barra vertical indica a força muscular desenvolvida (em mg) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **B**: Representação gráfica dos valores de força de contração muscular expressos em porcentagem da força muscular obtida quando os feixes foram expostos à solução de Ringer 100. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

A



B

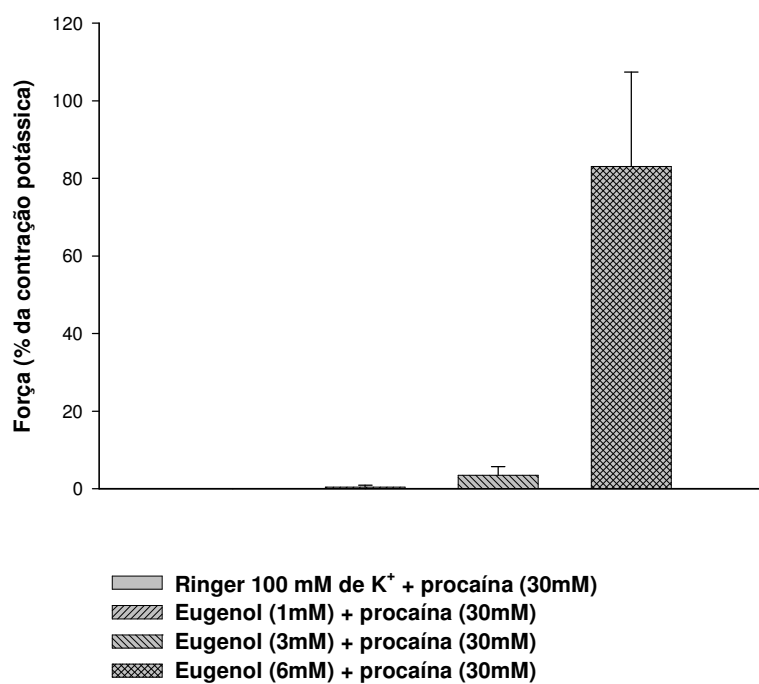


Figura 23- Efeito da rianodina (100 μ M) na contração induzida pela cafeína (10 mM) ou eugenol (10 mM), em feixes de músculo peitoral abdominal de rã. Em **A**: Registro de um experimento típico mostrando a contração promovida pela exposição dos feixes musculares à solução contendo 100 mM de K^+ . A manutenção dos feixes de fibras em solução de Ringer Normal na presença de rianodina (100 μ M) determinou contração sustentada. Em **B**: rianodina (100 μ M), induziu contração muscular dos feixes musculares oriundos do mesmo músculo. Após completo relaxamento, houve bloqueio da contração hipercalêmica e das contrações, normalmente, induzidas pela cafeína (10 mM) ou eugenol (10 mM). Em **C**: Contração induzida pela rianodina em solução de Ringer 100 mM de K^+ . Após relaxamento completo, os feixes de células musculares foram transferidos para solução de Ringer Normal na presença de rianodina. Nesta situação a rianodina promoveu bloqueio das contrações normalmente induzidas pela cafeína ou eugenol. As barras verticais indicam o período de tempo em que os feixes estiveram expostos a rianodina (100 μ M) e as linhas tracejadas o tempo em que o polígrafo esteve desligado. O intervalo de tempo transcorrido entre o início da contração induzida pela rianodina até o completo relaxamento da preparação foi de aproximadamente 2 horas. Os símbolos ($\uparrow_{R4}$) e ($\uparrow_{R100}$) indicam, respectivamente, os momentos em que as preparações foram expostas à solução de Ringer Normal (4 mM de K^+) e à solução contendo 100 mM de K^+ (Ringer 100). Calibração: a barra vertical indica a força muscular desenvolvida (em Newton) e a horizontal, o tempo (em segundos).

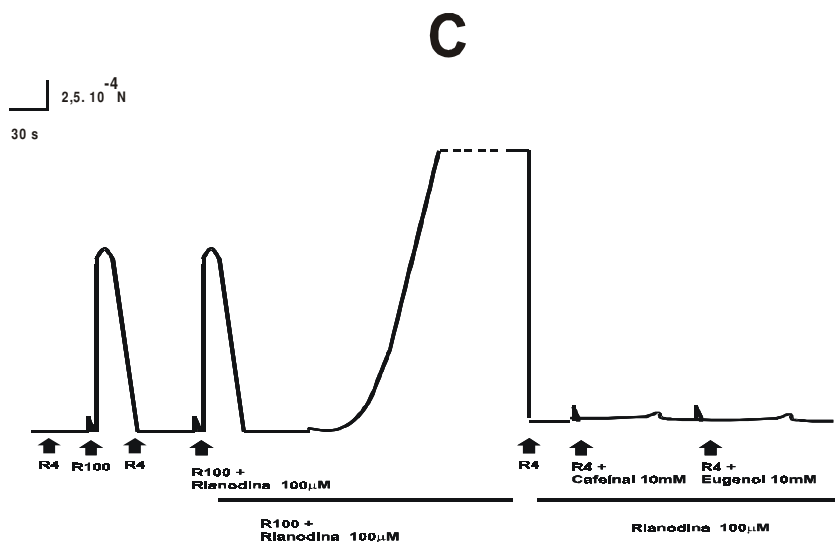
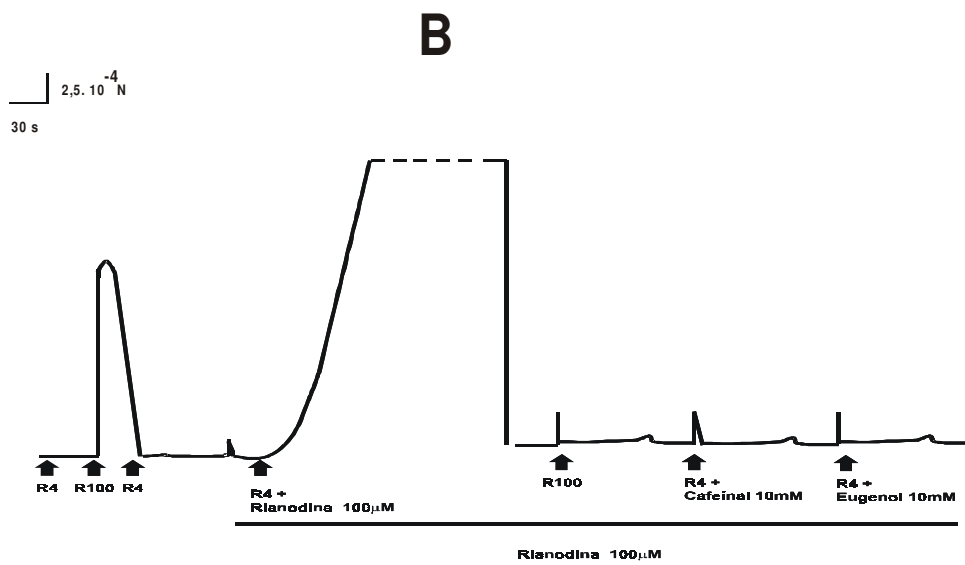
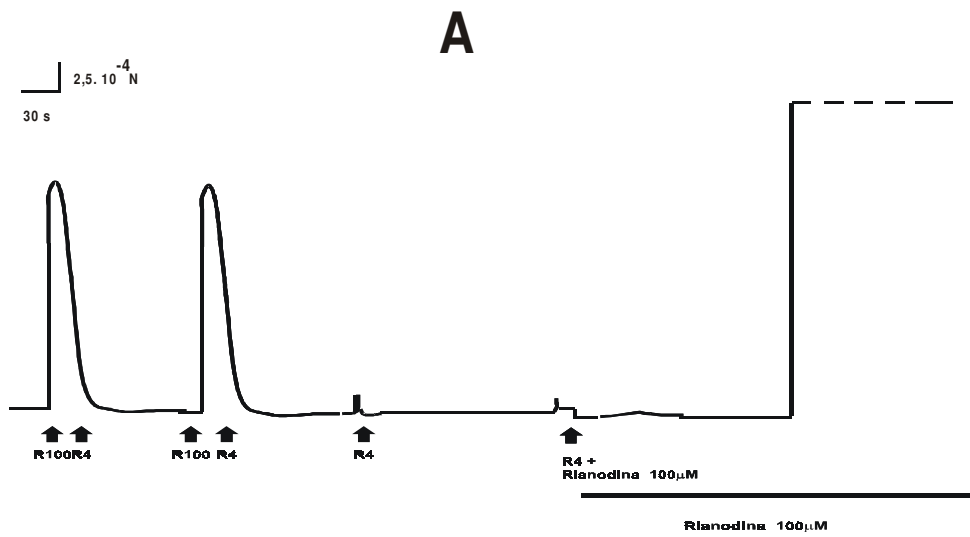


Figura 24- Efeitos do dantrolene (5 mg.ml^{-1}), na contração induzida pelo eugenol (6 mM) em músculo peitoral abdominal de rã. Em **A**: Registro original de um experimento demonstrando as contrações promovidas pela exposição dos feixes de fibras à solução de Ringer 100 mM de K^+ (Ringer 100) e ao eugenol presente em solução de Ringer Normal. Em **b**: Após contração induzida pela solução de Ringer 100 mM de K^+ , a preparação foi incubada em solução de Ringer Normal contendo dantrolene por 30 minutos. Nestas condições o dantrolene ocasionou bloqueio das contrações induzidas pela solução hipercalêmica e pelo eugenol. A barra horizontal representa o intervalo em que a preparação foi submetida ao dantrolene e as barras verticais menores (||) o período de 30 minutos em que o polígrafo foi mantido desligado. Os símbolos $\uparrow_{\text{R4}}$ e $\uparrow_{\text{R100}}$ indicam, respectivamente, os momentos em que as preparações foram expostas à solução de Ringer Normal e à solução contendo 100 mM de K^+ (Ringer 100). Calibração: a barra vertical indica a força muscular desenvolvida (em Newton) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **C**: representação gráfica dos valores de força de contração desenvolvida pelas preparações submetidas ao eugenol (6 mM), em solução Ringer 4 mM de K^+ , expressos em porcentagem da força muscular obtida quando os feixes de fibras foram expostos à solução de Ringer 100 mM de K^+ . Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

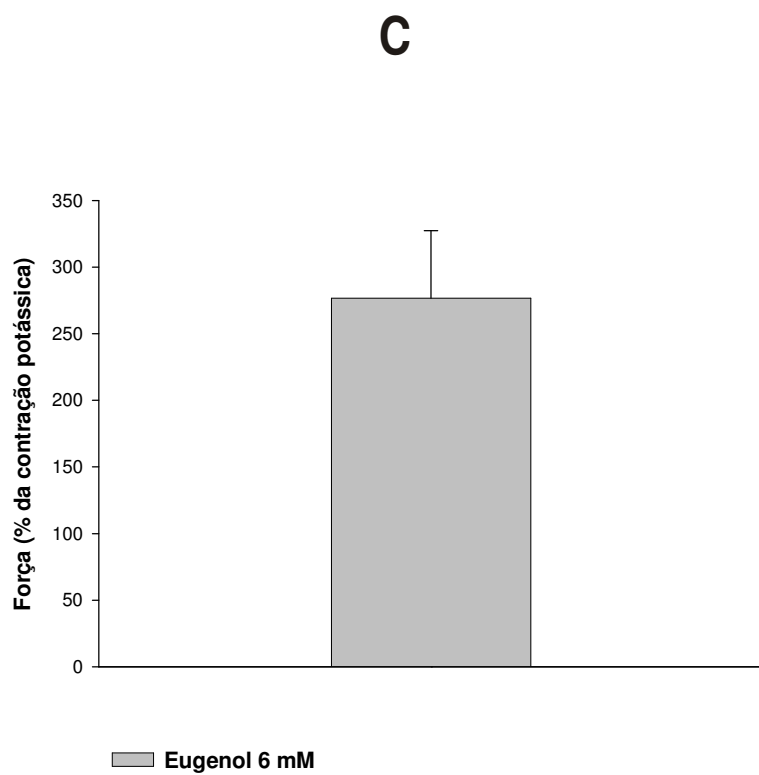
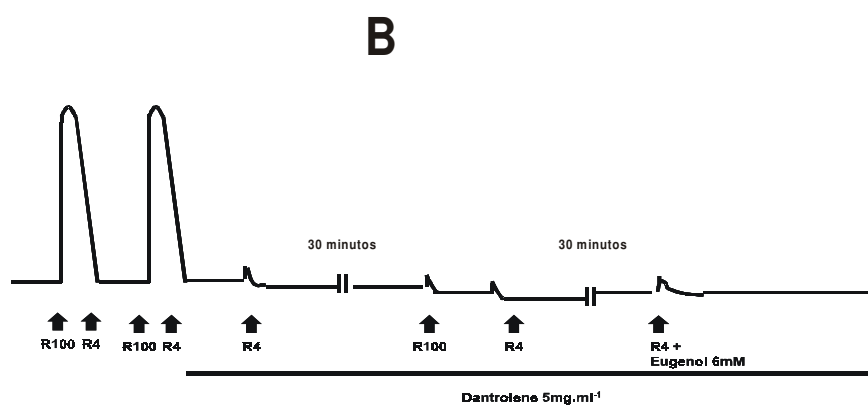
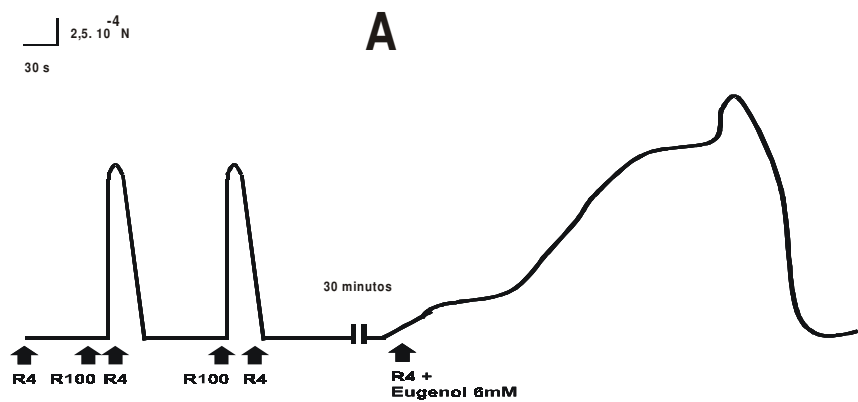
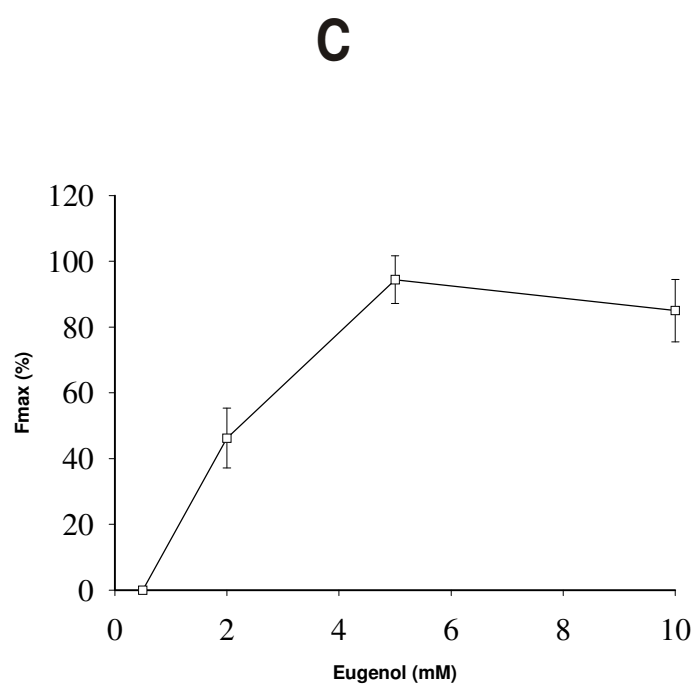
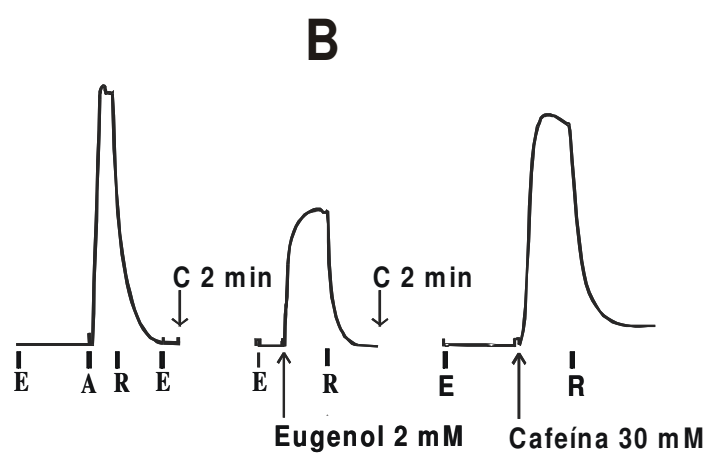
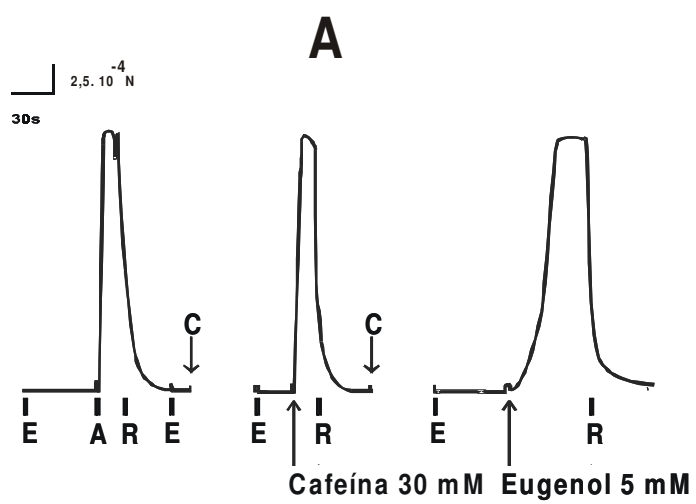


Figura 25- Efeito do eugenol (5 mM) ou da cafeína (30 mM) na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático de fibras permeabilizadas por saponina. Em **a**: registro original de um experimento típico, demonstrando a ativação do sistema contrátil induzida pelo Ca^{2+} liberado do retículo sarcoplasmático (RS) pela utilização da cafeína, de eugenol, ou pela exposição das fibras à solução A (pCa 4,0). Após o carregamento do RS com íons cálcio, por meio da manutenção das fibras na solução C (pCa 6,4), por dois minutos, efetuou-se transferência das mesmas para a solução E (pCa 8,5, 0,5 mM de EGTA). A seguir à fibra foi submetida à cafeína ou eugenol presentes na solução E. Após a contração promovida pela cafeína ou pelo eugenol, as fibras foram transferidas para a solução R (pCa 8,5, 5 mM de EGTA). A obtenção de força máxima foi realizada, sem prévio carregamento, por meio da exposição das fibras à solução A. Em **b**: protocolo idêntico ao anterior, entretanto utilizando eugenol (2 mM) ou cafeína (30 mM) após carregamento do RS com cálcio por 2 minutos. Calibração: a barra vertical representa a força (em Newton) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **c**: Representação gráfica dos valores de força de contração desenvolvida por preparações expostas ao eugenol (1, 5 e 10 mM), expressos em porcentagem da força máxima, obtida por ativação da fibra em solução A. Os valores estão expressos como a média $\pm$ o erro padrão.



3.14 Efeitos da Tetracaína (1 mM), nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM) e eugenol (5mM), em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina

Os efeitos da tetracaína, um antagonista dos canais de liberadores de cálcio presentes na membrana retículo sarcoplasmático (CSERNOCH *et al.*, 1999; CHAWLA *et al.*, 2001), nas contrações induzidas pela cafeína e eugenol foram avaliados em fibras estriadas esqueléticas permeabilizadas com saponina. Os resultados estão mostrados na Figura 26.

Os valores obtidos foram normalizados para aqueles observados quando as fibras foram expostas a solução pCa 4,0 (solução A). Após a fibra ter sido exposta à solução pCa 4,0 realizou-se o carregamento do RS, por dois minutos, e posterior exposição da fibra à solução E contendo cafeína (30 mM). A cafeína induziu contração muscular cuja força alcançou $79,51 \pm 6,96$ % da $F_{m\acute{a}x}$ (n=6). Após o retículo sarcoplasmático ter sido carregado com Ca^{2+} , durante 2 minutos, a fibra foi exposta, durante 15 minutos, à solução E, na qual adicionou-se tetracaína (1mM). Passado o tempo de incubação com tetracaína a fibra foi transferida para a câmara contendo solução E na presença de tetracaína e cafeína. Idêntico protocolo foi realizado com eugenol (5 mM).

Os dados demonstram que a tetracaína determinou bloqueio da contração induzida pela cafeína, mas não aboliu a contração promovida pela exposição da fibra ao eugenol, cujo valor foi de $66,33 \pm 6,08$ % da $F_{m\acute{a}x}$ (n= 6).

3.15 Efeitos da neomicina (10 mM), nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM) ou eugenol (5 mM), em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina

A neomicina, um antibiótico aminoglicosídeo que atua como potente inibidor da liberação de íons cálcio a partir do retículo sarcoplasmático (WANG, 1996; WILD, 2000) foi testada para analisar seus efeitos sobre as contrações induzidas

pela cafeína (30 mM) ou pelo eugenol (5 mM), em fibras permeabilizadas por saponina.

Os valores foram normalizados para aqueles obtidos quando as fibras foram expostas à solução pCa 4,0 (solução A) .

Analisando a Figura 27, verificamos que após carregamento do retículo sarcoplasmático com cálcio, mediante a exposição das fibras à solução C, a cafeína presente na solução E desencadeou contração muscular que atingiu $97,70 \pm 13,27\%$ ($n=6$) da F_{max} . Após novo carregamento do retículo e incubação com neomicina (10 mM) , por 30 minutos, a exposição das fibras à solução E contendo cafeína (30 mM) na presença de neomicina (10 mM), desencadeou contração com valor médio de força de $7,71 \pm 4,45\%$ daquele produzido pela ativação máxima do sistema contrátil (induzida com pCa 4,0). Protocolo idêntico foi realizado com o eugenol. A presença de neomicina bloqueou a contração induzida pelo eugenol. O valor médio de força obtido nestas condições foi de $7,79 \pm 2,8\%$ da F_{max} .

Esses resultados indicam que a neomicina determinou bloqueio, embora não completo, da contração induzida pela cafeína e eugenol.

3.16 Inibição das contrações induzidas pela cafeína (30 mM) e eugenol (5 mM) pelo vermelho de rutênio em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina .

O vermelho de rutênio (10 μ M) é um corante policatiônico que atua inibindo a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático (RS) e, por meio do bloqueio do mecanismo de liberação de “cálcio induzida pelo cálcio” (MIYAMOTO e RACKER, 1981; DUKE e STELLE, 2000). Os efeitos desse composto sobre as contrações induzidas pela cafeína (30 mM) ou eugenol (5 mM), foram investigados em fibras permeabilizadas por saponina.

Os valores foram normalizados para aqueles obtidos quando as fibras foram expostas à solução pCa 4,0 ($F_{máx}$). Conforme pode ser observado na Figura 28 A, após o carregamento do retículo sarcoplasmático com cálcio, por

meio da exposição das fibras à solução C, verifica-se que a amplitude média de contrações oriundas da exposição das fibras à solução E contendo cafeína (30 mM) foi de $90,7 \pm 6,5$ % da $F_{\text{máx}}$ (n=26).

De forma semelhante, após o carregamento do RS com Ca^{2+} verificou-se que a amplitude média de contração das fibras submetidas à solução E na presença de eugenol (5 mM) foi de $86,77 \pm 5,5\%$ da $F_{\text{máx}}$ (n=28).

Na figura 28 B, verificamos que após o carregamento do RS com Ca^{2+} e incubação nas fibras, por 15 minutos, em solução E contendo vermelho de rutênio (10 μM), ocorreu completo bloqueio da contração quando as fibras foram submetidas a solução E contendo cafeína (30 mM) (n= 4, $p < 0,001$). De forma similar a incubação com vermelho de rutênio, por 15 minutos, promoveu bloqueio da contração induzida pela exposição das fibras ao eugenol (5 mM) (n= 4, $p < 0,001$).

3.17 Efeitos da rianodina (200 μM), nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM) e pelo eugenol (5 mM) em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por saponina.

Os efeitos da rianodina, um antagonista dos canais liberadores de cálcio/receptores rianodínicos (LAMB e STEPHENSON, 1990; MEAD e WILLIAMS, 2002) nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM) ou pelo eugenol (5 mM) estão demonstrados na Figura 29.

Os valores obtidos foram normalizados para os encontrados quando as fibras foram submetidas à solução pCa 4,0 ($F_{\text{máx}}$). Conforme podemos observar, após carregamento do retículo sarcoplasmático com cálcio, e incubação das fibras em solução E contendo rianodina (200 μM) por 15 minutos houve completo bloqueio da contração promovida pela exposição das fibras à cafeína (30 mM) em solução E na presença de rianodina (200 μM).

De forma adicional, a rianodina não aboliu completamente a contração promovida pelo eugenol (5 mM) presente na solução E, mas reduziu de forma marcante a amplitude média das contrações que foi $38,4 \pm 13,6\%$ da $F_{\text{máx}}$ (n=8, $p < 0,001$).

Figura 26- Efeitos da tetracaína (1 mM) nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM) ou eugenol (5 mM) em fibras permeabilizadas com saponina. Em **a**: Registro original de um experimento típico mostrando a ativação máxima do sistema contrátil, por meio da exposição da fibra à solução A (pCa 4,0). Após ativação máxima a fibra foi transferida para a solução R (pCa 8,5 5 mM de EGTA) e realizou-se carregamento do retículo sarcoplasmático (RS) com cálcio, por meio da transferência da fibra para a solução C (pCa 6,4) e mantendo-a nessa condição por dois minutos. Após o carregamento, a fibra foi mergulhada na solução E (pCa 8,5 - 0,5 mM de EGTA) e posteriormente foi induzida a liberação de cálcio do RS por meio da passagem da fibra pela solução E na presença de cafeína (30 mM). Após relaxamento da fibra, obtido pela transferência dessa para a solução R, efetuou-se novo carregamento, por meio da exposição da fibra à solução C, durante dois minutos. A seguir, a fibra foi incubada com tetracaína, por 15 minutos, e transferida para a câmara contendo cafeína (30 mM) ou eugenol (5mM). As barras verticais menores (II) representam o período de incubação. .Calibração: a barra vertical representa a força (em Newton) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **b**: Representação gráfica dos valores de força de contração desenvolvida por preparações expostas à cafeína ou eugenol, e o efeito da tetracaína sobre essas contrações, expressos em porcentagem da força máxima, obtida por ativação da fibra em solução A. Os valores estão expressos como a média $\pm$ o erro padrão.

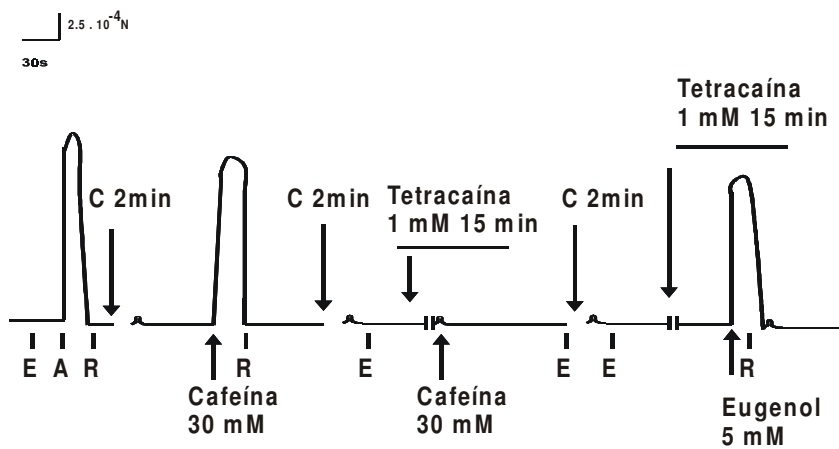
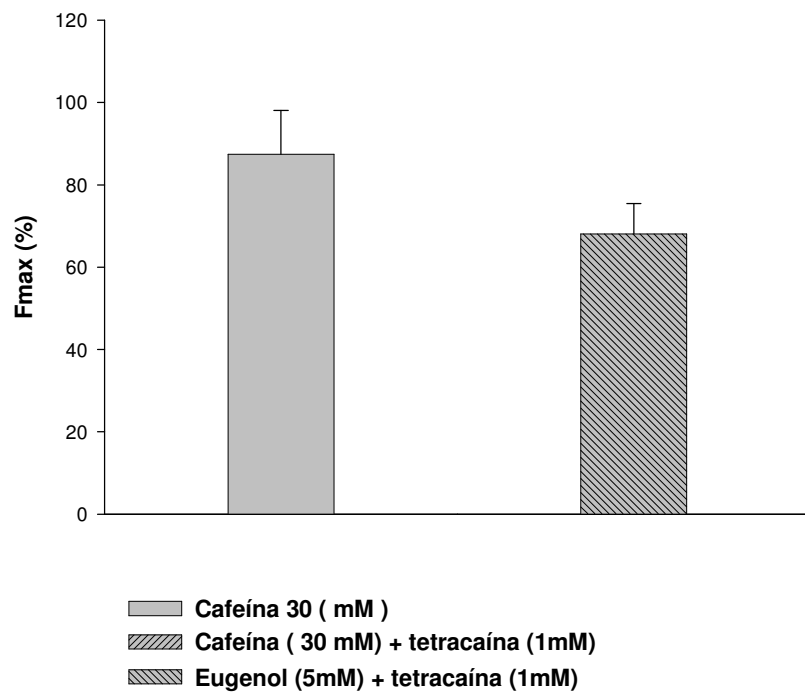
A**B**

Figura 27- Inibição pela neomicina (10 mM) das contrações induzidas pela cafeína (30 mM) ou eugenol (5 mM) em fibras permeabilizadas com saponina. Em **a**: Registro original de um experimento típico mostrando a ativação máxima do sistema contrátil obtido por meio da exposição da fibra à solução A (pCa 4,0) e relaxamento por meio da transferência da mesma à solução R (pCa 8,5, 5 mM de EGTA). Após carregamento do retículo sarcoplasmático (RS), com cálcio, obtido pela manutenção da fibra na solução C (pCa 6,4) por dois minutos, essa foi transferida para a solução E (pCa 8,5, 0,5 mM de EGTA). A seguir foi induzida a liberação de cálcio do RS por meio da passagem da fibra pela solução E na presença de cafeína (30 mM). Após ter obtido relaxamento da fibra, por meio da transferência dessa para a solução R, efetuou-se novo carregamento do RS, como descrito anteriormente, e a fibra foi mergulhada na solução E, e mantida sob incubação com neomicina (10 mM) por 30 minutos. Ao final desse período a fibra foi submetida a solução E contendo cafeína (30 mM) ou eugenol (10mM) na presença de neomicina (10 mM). As barras verticais menores (||) indicam o período de incubação. Calibração: barra horizontal o tempo (em segundos) e a vertical a força (em Newton). Em **b**: Representação gráfica das contrações promovidas pela cafeína e o efeito da neomicina sobre as contrações induzidas pela cafeína ou eugenol, expressos em porcentagem da força máxima, obtida por ativação da fibra em solução A. Os valores estão expressos pela média $\pm$ erro padrão.

Figura 28- Inibição das contrações induzidas pela cafeína (30 mM) ou eugenol (5mM) ocasionada pelo vermelho de rutênio de fibras permeabilizadas com saponina. Em **a**: registro original de um experimento típico, demonstrando a ativação do sistema contrátil induzida pela liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) quando da utilização da cafeína (30 mM), de eugenol (5 mM) , ou pela exposição das fibras à solução A (pCa 4,0). A exposição das fibras a cafeína ou ao eugenol foi precedida pelo carregamento do RS em solução C (pCa 6,4, EGTA 5 mM). A obtenção de força máxima foi realizada, sem prévio carregamento, por meio da exposição das fibras à solução A. Em **b**: Após carregamento do Rs com cálcio, por meio da exposição da fibra à solução C, a preparação foi incubada com vermelho de rutênio (10 μM), por 15 minutos, antes de nova exposição da fibra à solução E na presença de cafeína (30 mM) ou eugenol (5 mM). Os símbolos A, R, C e E, indicam respectivamente, soluções A, R, C e E. As barra horizontais indicam o tempo em que as preparações ficaram expostas à solução E na presença de vermelho de rutênio e as duas barras horizontais menores (||) o período de incubação. Calibração: a barra horizontal representa o tempo (em segundos) e a vertical , a força (em mg).

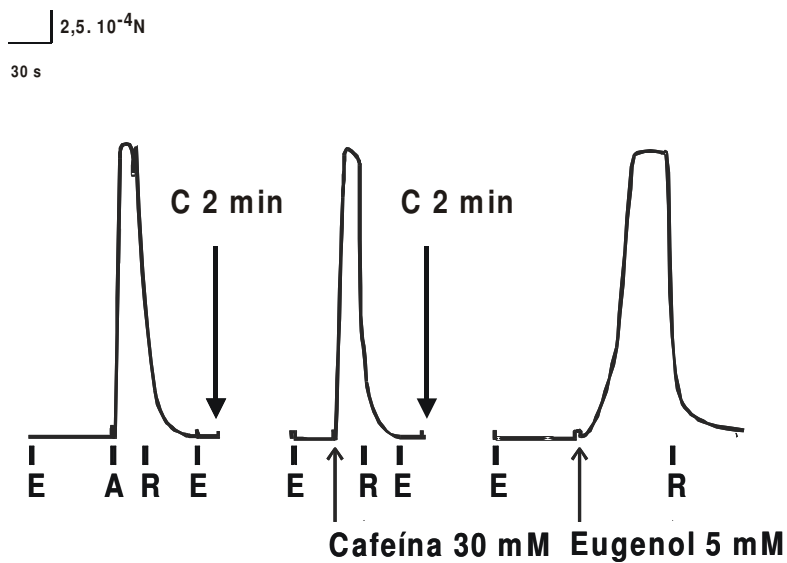
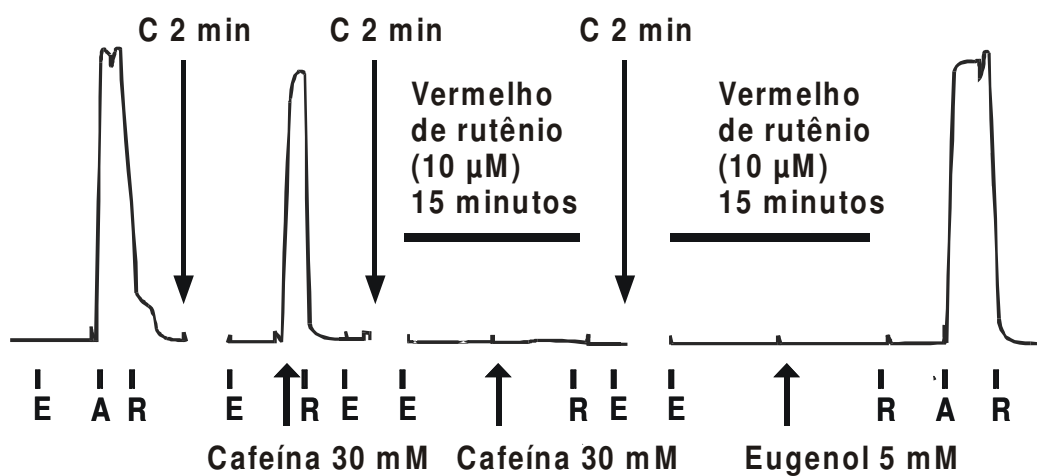
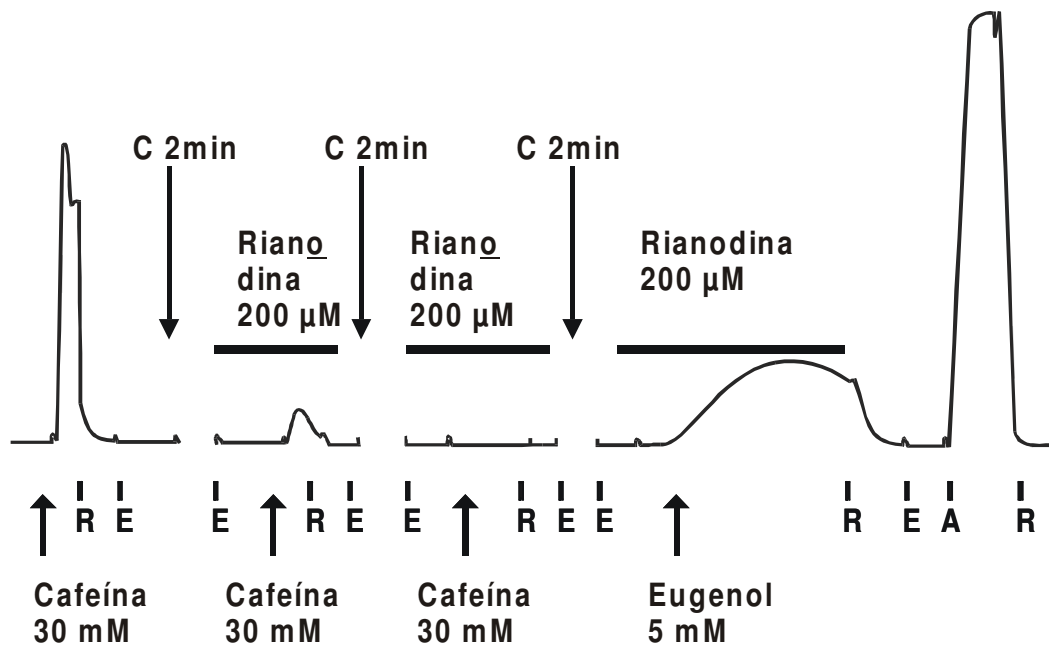
A**B**

Figura 29- Efeitos da rianodina (200 μ M) nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM) ou pelo eugenol (5 mM) em fibras permeabilizadas por saponina. Registro original de um experimento típico, mostrando a contração induzida pela cafeína, como consequência da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS). A preparação foi mantida inicialmente em solução R (pCa 8,5, 5 mM de EGTA) e à seguir a mesma teve ser RS carregado com íons cálcio, por meio da transferência da fibra para a solução C (pCa 6,4), onde permaneceu por dois minutos. Após o carregamento, a célula foi transferida para a solução E (pCa 8,5, 0,5 mM de EGTA) e posteriormente foi induzido a liberação de cálcio do RS através da passagem da fibra pela solução E, contendo cafeína (30 mM). Após o relaxamento da fibra, obtido pela transferência dessa para a solução R, realizou-se novo carregamento, como indicado anteriormente, e a fibra foi incubação em solução E na presença de Rianodina (200 μ M), por 15 minutos. Dois ciclo de carregamento e incubação com rianodina (200 μ M) , foram necessário para completo bloqueio da liberação de íons cálcio, quando as fibras firam expostas à solução E contendo cafeína (30 mM) na presença de rianodina (200 μ M) . De forma complementar, após carregamento das fibras com cálcio e incubação em solução E contendo rianodina (200 μ M) , efetuou-se exposição das mesma à solução E contendo eugenol (5 mM) na presença de rianodina (200 μ M) . Ao final do protocolo, realizou-se ativação máxima do sistema contrátil, por meio da exposição das fibras à solução A. A barra horizontal indica o período em que a fibra ficou exposta á rianodina e as duas barras verticais menores o tempo de incubação. Os símbolos A, R, C e E, indicam respectivamente, soluções A, R, C e E. Calibração: a barra vertical indica a força (em mg) e a horizontal , o tempo (em segundos)


 $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ N}$
 30 s



3.18 Inibição pela heparina ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), da liberação de Ca^{2+} induzida pelo eugenol (5 mM), em fibra esquelética (sartório) permeabilizada por saponina

Os efeitos da heparina ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), um antagonista dos receptores InsP_3 (KOBAYASHI *et al.*, 1988; TALON *et al.*, 2002), nas contrações induzidas pela cafeína (30 mM) e pelo eugenol (5 mM), foram investigados em fibras musculares esqueléticas permeabilizadas com saponina. Em nossas condições experimentais, após o carregamento do retículo sarcoplasmático com íons cálcio, a adição de heparina à solução E não promoveu contração. Como ilustrado na Figura 30 A , a incubação das fibras em solução E na presença de heparina , por 15 minutos, inibiu as contrações induzidas pela cafeína (30mM). A amplitude média das contrações na presença de heparina ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) foi de $69,3 \pm 1,1\%$ da $F_{\text{máx}}$ ($n=6$) e na ausência desse polissacarídeo sulfatado o valor obtido foi de $84,7 \pm 2,6 \%$ da $F_{\text{máx}}$ ($n=6$, $p < 0,001$). Estudos prévios têm demonstrado que a heparina apresenta efeito inotrópico negativo no aparato contrátil em fibras esqueléticas de murinos (TALON *et al.*, 1997). Com objetivo de avaliar a possibilidade de que a inibição da contração induzida pela cafeína, obtida na presença de heparina, pudesse ocorrer ao nível do aparato contrátil e não na liberação de Ca^{2+} do RS, investigamos os efeitos da heparina na ativação de fibras, permeabilizadas com Triton X-100, por solução pCa 4,0 ($F_{\text{máx}}$) (Figura 30 B) A $F_{\text{máx}}$ na presença de heparina foi de $84,4 \pm 5,6 \%$ do controle na ausência desse composto ($n = 6$, $p < 0,001$). Como a inibição média da contração induzida pela cafeína presente na solução E ou por solução pCa 4,0 obtida na presença da heparina não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, assumimos que o efeito inibitório da heparina nas contrações promovidas pela cafeína (30mM) foi devido ao efeito da heparina sob a maquinaria contrátil e não na liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. Por outro lado, a amplitude média das contrações induzidas pelo eugenol em solução E na presença de heparina ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) foi de $17,7 \pm 5,5\%$ da $F_{\text{máx}}$. Este efeito não pode ser explicado apenas pela influência inibitória da heparina no sistema

contrátil uma vez que a inibição média das contrações induzidas por solução pCa 4,0 na presença de heparina ter sido significativamente menor (15,6 %) que a inibição obtida por esse composto nas contrações induzidas pelo eugenol (5 mM), cujo valor foi de 82, 3% ($p < 0,05$). No grupo de experimentos ($n=5$) onde se realizou exposição das fibras, após carregamento do RS com cálcio, à solução com eugenol (5mM) na ausência de heparina, a amplitude média das contrações induzidas pelo eugenol atingiu $99,0\% \pm 0,6\%$ da $F_{\text{máx}}$. ($p < 0,001$). A Figura 30 C ilustra um experimento típico no qual a contração induzida pelo eugenol foi marcadamente inibida pela heparina.

3.19 Efeitos do eugenol (1,5 e 10 mM) na força máxima de contração em fibra muscular esquelética (sartório) permeabilizada por Triton X-100

A influência do eugenol na sensibilidade do aparato contrátil ao íon Cálcio, bem como na produção de força, foi investigada em fibras musculares estriadas esqueléticas permeabilizadas pelo detergente não-iônico Triton X-100. Conforme demonstrado na Figura 31 A, a adição de 5 mM de eugenol não produziu alteração da sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio e no grau de cooperatividade das proteínas contráteis. Variando-se a concentração de eugenol (1, 5 e 10 mM), quando acrescentado na solução com pCa 4,0, nenhuma alteração significativa na força máxima produzida pela fibra foi detectada. Os valores de força máxima obtida foram, respectivamente, de $100, 48 \pm 2,61 \%$, $95,53 \pm 2,32 \%$ e $97,42 \pm 4,85 \%$, em relação aqueles obtidos na ausência desse composto.

Figura 30 - Heparina ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) inibe a liberação de Ca^{2+} induzida pelo eugenol (5 mM) , mas não suprime a contração promovida pela cafeína (30 mM) em fibras permeabilizadas por saponina. Em **a**: Registro original de um experimento típico demonstrando, inicialmente, a ativação máxima do sistema contrátil por meio da exposição da fibra à solução A (pCa 4,0), em seguida relaxamento da mesma , através da transferência para a solução R (pCa 8,5, 5 mM de EGTA). À seguir, realizou-se carregamento do retículo sarcoplasmático (RS), com íons cálcio, graças á exposição da fibra à solução C (pCa 6,4), por dois minutos. Posteriormente, determinou-se liberação de cálcio do RS através da passagem da fibra pela solução E (pCa 8,5, 0,5 mM de EGTA) na presença de cafeína (30 mM). Após relaxamento, por meio da exposição da fibra à solução R, promoveu-se novo carregamento do RS, com descrito anteriormente, e a fibra foi mantida sob incubação em solução E contendo heparina (mg.ml^{-1}), antes de efetuar nova liberação de íons cálcio do RS , por meio da transferência da fibra para a solução E contendo cafeína (30 mM) na presença de heparina (mg.ml^{-1}). Em **b**: Registro original de um protocolo típico demonstrando a ativação máxima do sistema contrátil, em fibras permeabilizadas por Triton X-100, na ausência e presença de heparina (mg.ml^{-1}) Em **c**: Registro original de um experimento, demonstrando o efeito da heparina (mg.ml^{-1}) na contração induzida pelo eugenol (5 mM) . Inicialmente promoveu-se o carregamento do RS, através da exposição da fibra à solução C, por 2 minutos. A seguir promoveu-se incubação da mesma em solução E, na presença de heparina, seguido de exposição da fibra à solução E contendo eugenol (5 mM) e heparina (mg.ml^{-1}). A barra vertical indica o tempo em que a fibra foi exposta a heparina.

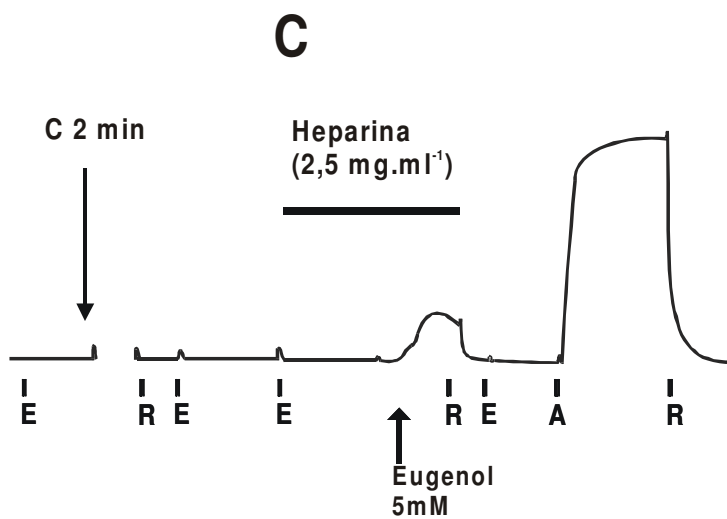
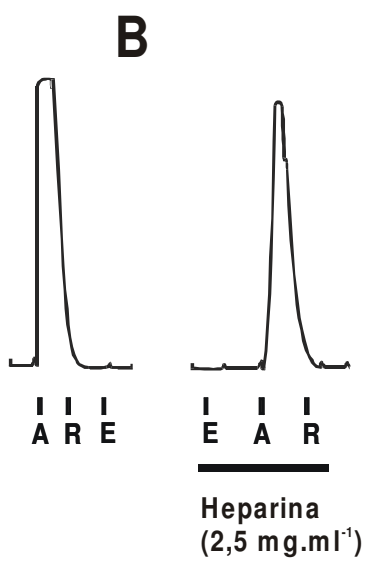
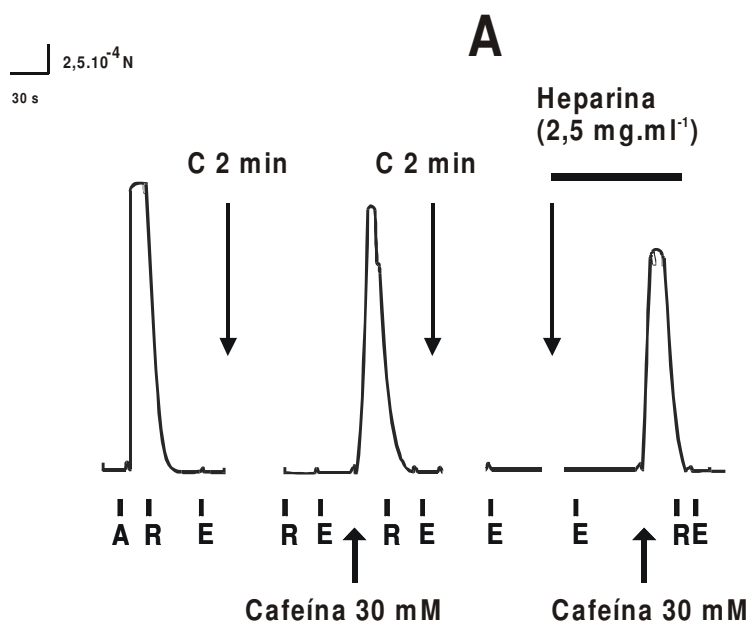
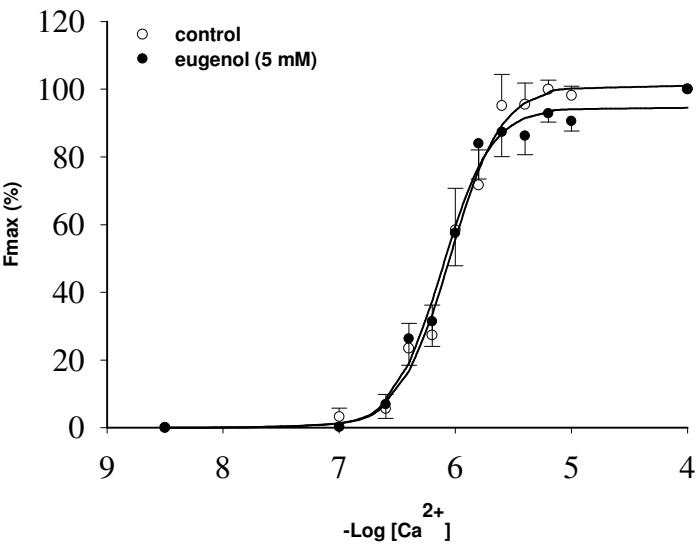
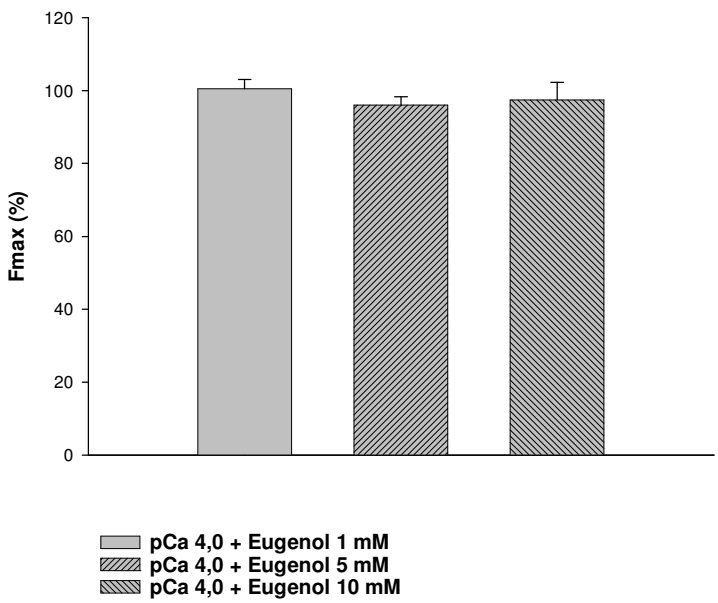


Figura 31- Efeito do eugenol (1, 5 e 10 mM) na relação força/[Ca²⁺] em fibras permeabilizadas por Triton X-100. Em **a**: Representação gráfica da ativação do sistema contrátil por diferentes concentrações de íons cálcio, na presença de 5 mM de eugenol (círculos cheios) e na ausência desse composto (círculos vazios). As barras verticais representam o erro padrão da média e a ausência destas indica que o erro padrão foi menor que a dimensão do símbolo. Os valores de K ([Ca²⁺]₅₀) e N (coeficiente de Hill) na ausência de eugenol foram de $1,11 \cdot 10^{-6} \pm 3,07 \cdot 10^{-7}$ M e $3,07 \pm 0,71$, respectivamente. Na presença de eugenol (5 mM) obteve-se um valor de K igual a $9,95 \cdot 10^{-7} \pm 2,05 \cdot 10^{-7}$ M e o valor de N igual a $3,26 \pm 0,88$. Em **b**: Representação gráfica da ativação do sistema contrátil com solução pCa 4,0 na presença de eugenol (1, 5 e 10 mM): os valores foram normalizados para ativação máxima obtida pela exposição das fibras à solução pCa 4,0, na ausência de eugenol. Os dados estão expressos como a média $\pm$ erro padrão.

A



B



4. DISCUSSÃO

O eugenol é um constituinte de óleos essenciais que apresenta marcante efeito em diferentes tecidos excitáveis (STICHT e SMITH, 1971; CARLINI *et al.*, 1983; REITER e BRANDT, 1985; LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994; NISHIJIMA *et al.*, 1998; LOFRANO-ALVES, *et al.*, 2000; SILVEIRA-GOMES, 2000; LEAL-CARDOSO *et al.*, 2002; DAMIANI, 2003; CRIDDLE *et al.*, 2003).

Nesse trabalho por meio da utilização de células musculares esqueléticas intactas ou permeabilizadas por saponina ou com Triton X 100, bem como empregando diversos agentes farmacológico, que atuam como bloqueadores de canais de Ca^{2+} presentes na membrana do sistema tubular transversal e na membrana do RS, investigamos os efeitos do eugenol no mecanismo de AEC.

Esse composto quando empregado em concentrações acima de 3 mM promove contração em músculo sartório e peitoral abdominal de anfíbio, mantidos em soluções de Ringer Normal (Figuras 13, 14, 15, 16). Esse fato foi também observado em fibras musculares isoladas de músculo sartório permeabilizadas com saponina, as quais tiveram o retículo sarcoplasmático (RS) carregado com íons cálcio (Figura 25).

A contração induzida pelo eugenol em células intactas mostrou-se sustentada e com baixa reprodutibilidade, uma vez que a remoção do eugenol promovida por sucessivas lavagens das células em solução de Ringer Normal determinou relaxamento lento e a subsequente exposição ao eugenol não induziu novas contrações.

Nas fibras permeabilizadas por saponina, as quais tiveram o retículo sarcoplasmático carregado com cálcio, o eugenol ocasionou contração como consequência da liberação de cálcio do RS (Figura 25).

Nos experimentos utilizando células intactas ou permeabilizadas por saponina avaliou-se os efeitos da cafeína, um composto amplamente empregado para o estudo da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (KIM *et al.*, 1997; HUANG, 1998; RITTER *et al.*, 2001).

A indução de contração muscular promovida pelo eugenol poderia ser resultado de um ou da combinação de vários fatores: despolarização do sarcolema, ativação do sensor de voltagem presente na membrana do sistema tubular transverso, abertura dos canais de cálcio presentes na membrana do RS, ou ainda ativação direta do sistema contrátil.

Por diversas razões é possível sugerir que o efeito de indução de contração promovida pelo eugenol não é, provavelmente, oriunda da despolarização do sarcolema. Isso porque em preparações de músculo sartório isolado intacto de anfíbio, mantido em meios extracelulares contendo 4 ou 60 mM de K^+ , o eugenol pouco modificou os valores do potencial de membrana medidos por meio da utilização de microeletrodos intracelulares (LEAL CARDOSO *et al.*, 1994). Além disso, a contração promovida pelo eugenol foi observada em preparações mantidas em solução de Ringer 100 mM de K^+ situação que suprime a excitabilidade da membrana celular (Figura 14).

Nessa condição, o potencial de membrana das células musculares aproxima-se de -10 mV (ZACHAR, 1971) e com essa diferença de potencial tanto os receptores DHP quanto os canais de sódio presentes no sarcolema encontram-se inativos (RIOS E PIZARRO, 1991; NEUMANN *et al.*, 1996; BEZANILLA, 2000). Portanto, o eugenol não pode, nessas condições, ativá-los. Por idênticas razões o efeito do eugenol não pode também ser atribuído a uma ativação dos canais de Ca^{2+} (receptores DHP).

Outra evidência da ausência do envolvimento dos receptores DHP na ação do eugenol, provém dos resultados dos experimentos em que se utilizou antagonista de canais lentos de cálcio simultaneamente à remoção do cálcio externo e adição de EGTA. Nessa condição experimental não houve alteração da resposta contrátil induzida pelo eugenol (Figura 17). A utilização de nifedipina (antagonista de canais lentos de Ca^{2+}) (McCLESKEY, 1985), aboliu a contração induzida pela exposição do músculo a solução contendo 100 mM de K^+ (DULHUNTY e GAGE, 1988), mas não afetou a contração originária da exposição das células musculares ao eugenol (Figura 17). Desse modo é possível sugerir

que a contração produzida pelo eugenol ocorre como consequência de alteração de uma etapa posterior a ativação do sensor de voltagem.

Assim, investigamos a possibilidade do eugenol estar agindo diretamente no sistema contrátil ou promovendo liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares por mecanismos independentes às variações da diferença de potencial da membrana celular.

A possibilidade do eugenol estar interferindo diretamente no sistema contrátil foi investigada através da utilização de fibras permeabilizadas com Triton X 100 (Figura 31). A utilização dessa técnica permite estudar os efeitos diretos de diferentes substâncias no sistema contrátil, uma vez que esse detergente não-iônico promove remoção dos elementos membranosos presentes nas células sem alterar estrutural e funcionalmente o sistema contrátil (GODT *et al.*, 1982; GODT *et al.*, 1991; LAMB *et al.*, 1994).

Nesse procedimento experimental a ativação do sistema contrátil é obtida por meio da exposição da fibra a diferentes concentrações de íon cálcio. Os dados obtidos permitem, também, avaliar o grau de cooperatividade das proteínas regulatórias do sistema contrátil, bem como a sensibilidade do mesmo ao íon cálcio (YOSHIOKA *et al.*, 1986; GODT *et al.*, 1991). A cooperatividade é dada pela inclinação (coeficiente de Hill), da curva força versus concentração de cálcio e a quantidade de cálcio necessária para se obter 50% da força contrátil máxima fornece a sensibilidade do sistema contrátil a esse íon (ANDREWS *et al.*, 1991; GODT *et al.*, 1991).

Os dados obtidos nesse trabalho (Figura 31) permitem afirmar que na presença do eugenol não houve alteração da sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio ou cooperatividade do mesmo. Esses dados sugerem que a afinidade da troponina C pelo cálcio, a interação da cabeça da miosina, os outros fatores relacionados com a cooperatividade do sistema troponina-tropomiosina, bem como os estados de forte ligação da miosina com a actina não foram modificados pela presença do eugenol.

Assim, os resultados obtidos tanto em células intactas quanto em fibras permeabilizadas sugerem que a contração muscular induzida pelo eugenol é

ocasionada pela liberação de íon cálcio do retículo sarcoplasmático. Dessa forma, os mecanismos de ação do eugenol foram investigados por meio da utilização de antagonistas que promovem bloqueio da liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares, comparados com os observados com a cafeína.

Para avaliar essa possibilidade realizamos experimentos utilizando células intactas provenientes de músculo sartório ou peitoral abdominal de anfíbio, medindo-se o encurtamento ou desenvolvimento de força. Posteriormente, foram realizados, também, experimentos com fibras isoladas de músculo sartório permeabilizadas por saponina. Nesse último procedimento o uso desse glicosídeo promove a solubilização do colesterol presente no sarcolema e no sistema tubular transversal (LAUNIKOS e STEPHENSON, 1997). Como consequência, surgem perfurações na membrana celular. Essa técnica mantém íntegros o sistema contrátil, bem como a membrana do retículo sarcoplasmático que é destituída de colesterol (FANO *et al.*, 1989).

A utilização de fibras permeabilizadas por saponina permitiu a realização de experimentos em que o eugenol, a cafeína bem como os diferentes antagonistas dos canais de Ca^{2+} do RS, tivessem acesso às membranas dessa organela. E tal fato nos deu subsídios para sugerir a existência de um ou mais, possíveis, sítios de ação para o eugenol. Uma vez que a quantidade de informações acumuladas sobre os antagonistas utilizados e seus locais de ação, nos permitiria avaliar em que ponto da liberação de íons do RS estaria agindo o eugenol e comparar esses resultados aos obtidos com a cafeína, um agonista dos canais de cálcio do RS cujos aspectos funcionais estão muito bem esclarecidos (HERRMANN-FRANK *et al.*, 1999).

Avaliamos os efeitos de anestésicos locais, procaína e tetracaína, sobre as contrações induzidas pela cafeína (10mM) (ENDO, 1977; ENDO, 1985; PIKE *et al.*, 1989; VENOSA e HOYA, 1999). Em músculo sartório intacto o uso de procaína promoveu completo bloqueio da contração induzida pela cafeína (10 mM), mas não promoveu bloqueio das contrações induzidas pelo eugenol (1, 3 e 10 mM) (Figura 18 B). Fato esse que também foi observado quando se utilizou apenas uma única concentração de eugenol (10 mM) (Figuras 18 B e 21). A contração

muscular induzida pelo eugenol (1 a 6 mM) não foi bloqueada pela procaína, mesmo quando se empregou concentração de 30 mM desse anestésico (Figura 22). Esses resultados não coincidem com aqueles observados por Leal-Cardoso e colaboradores (LEAL CARDOSO *et al.*, 1994), pois esses investigadores demonstraram que a procaína bloqueou a contração muscular produzida pelo eugenol.

As razões para tais diferenças não estão ainda esclarecidas. Uma possibilidade, contudo, pode estar relacionada com os gêneros de anfíbios utilizados. Nesse trabalho utilizamos *Rana catesbiana*, enquanto que Leal – Cardoso e colaboradores (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994) empregaram *Bufo paracnemis*. Entretanto, essa possibilidade é pouco provável, uma vez que a maquinaria envolvida no processo de AEC é muito bem conservada na escala filogenética. Essa divergência só será dirimida quando o mesmo laboratório empregar em seus estudos a mesma espécie de anfíbio.

Os resultados obtidos com tetracaína (10 ou 20 mM) demonstraram que esse anestésico local, de forma semelhante ao observado com a procaína, promoveu bloqueio da contração induzida pela cafeína (10 mM) em músculo sartório intacto (Figura 19) e não aboliu a contração induzida pelo eugenol (Figuras 19 e 20).

Uma possibilidade de observar bloqueio da contração induzida pelo eugenol após incubação com procaína ou tetracaína seria o aumento da concentração desses anestésicos, contudo concentrações mais elevadas desses compostos são capazes de induzir contração muscular como consequência da liberação de Ca^{2+} do RS (HERBETTE *et al.*, 1982; VOLPE *et al.*, 1983; WOLOSKEK *et al.*, 1992), o que tornaria inviável a utilização dos mesmos.

Em fibras permeabilizadas com saponina também verificamos que a tetracaína (1mM) aboliu de forma marcante a contração induzida pela cafeína (30 mM), mas não promoveu bloqueio da contração induzida pelo eugenol (5 mM) (Figura 26) . A elevação da concentração de tetracaína, nessa preparação, poderia promover bloqueio da contração induzida pelo eugenol. Contudo, esse anestésico promove em fibras permeabilizadas com saponina liberação de íons

Ca^{2+} do RS (PIKE *et al.*, 1989). E tal fato dificultou o emprego de tetracaína, em altas concentrações, como antagonista dos efeitos do eugenol em fibras esqueléticas permeabilizadas com saponina.

Os resultados obtidos com procaína e tetracaína, citados anteriormente, apontam para um efeito do eugenol distinto ao observado para a cafeína. Uma vez que esses anestésicos determinaram bloqueio da contração induzida pela cafeína (SATO *et al.*, 1984; ENDO, 1985; PIKE *et al.*, 1989; VENOSA e HOYA, 1999), e não promoveram bloqueio da contração induzida pelo eugenol. Assim, havia a possibilidade do eugenol estar atuando por um mecanismo diferente daquele exercido pela cafeína (KIM *et al.*, 1997; HUANG, 1998; RITTER *et al.*, 2001).

Nesse sentido haveria duas possibilidades distintas, um efeito por meio da via medida pelo InsP_3 ou por um efeito direto do eugenol nos receptores RyR. Para avaliarmos essas duas possibilidades foram empregados diferentes antagonistas que atuam nessas duas vias.

A primeira hipótese foi levantada uma vez que diferentes trabalhos sugerem a existência de receptores InsP_3 em fibras musculares esqueléticas e as fibras musculares de anfíbios apresentam elevada produção de InsP_3 nas tríades (ROJAS e HIDALGO, 1990; SANCHEZ *et al.*, 1991). Além disso, experimentos com microinjeção desse composto, tanto em fibras esqueléticas de anfíbios quanto de murino, demonstraram a liberação de cálcio e a contração muscular (LOPEZ E TERZIC, 1996; TALON *et al.*, 1997; CATINOT *et al.*, 1998; TALON *et al.*, 1999, TALON *et al.*, 2000; ESTRADA *et al.*, 2001; TALON *et al.*, 2002).

Dessa forma, embora diversos autores indiquem que os receptores RyR são os responsáveis pela liberação de íons Ca^{2+} durante o mecanismo de AEC (FRANZINI-ARMSTRONG e JORGENSEN, 1994; FRANZI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; FILL e COPELLO, 2002) e que a produção de InsP_3 e sua interação com seu receptor esteja relacionada com a regulação da expressão gênica (PORTER *et al.*, 2002; ARAYA *et al.*, 2003) não descartamos que o eugenol poderia estar atuando por meio de uma via mediada pelos receptores InsP_3 . Visto que diversos estudos apontam que o InsP_3 poderia atuar como um importante mediador do mecanismo de AEC (VERGARA *et al.*, 1985; VOLPE *et*

al., 1985; DONALSON *et al.*, 1986) e que outros estudos demonstram tanto a presença desse composto quanto do receptor em fibras musculares esqueléticas (SANCHEZ *et al.*, 1991; ROJAS e HIDALGO, 1990). Além disso, outros trabalhos demonstram tanto a contração de músculo esquelético via InsP_3 , quanto o bloqueio da contração, por meio do emprego de antagonista específico, a heparina (LOPEZ e TERZIC, 1996; TALON *et al.*, 1997; CATINOT *et al.*, 1998; TALON *et al.*, 1999; TALON *et al.*, 2000; ESTRADA *et al.*, 2001; TALON *et al.*, 2002).

A heparina atua inibindo a liberação de íons cálcio do RS de células musculares lisas bem como do retículo endoplasmático em células de Purkinje, por meio de sua ação antagônica dos receptores InsP_3 /canais de Ca^{2+} (LOPEZ e TERZIC, 1996; PALADE *et al.*, 1989).

Embora, os efeitos do InsP_3 e do antagonismo da heparina não sejam amplamente aceitos em músculo esquelético (RITOV *et al.*, 1985; WALKER *et al.*, 1987; ROJAS e JAIMOVICH, 1990; RIOS e PIZARRO, 1991), diferentes estudos sugerem um efeito bloqueador da heparina na liberação de íons cálcio em fibras estriadas esqueléticas induzida pelo InsP_3 (LAMB *et al.*, 1994; LÓPEZ e TERZIC, 1996; TALON *et al.*, 1997).

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que a heparina promoveu bloqueio, quase total, da contração induzida pelo eugenol e não inibiu a liberação de cálcio induzida pela cafeína em fibras permeabilizadas por saponina (Figura 30).

A ausência de bloqueio da contração induzida pela cafeína, por meio da utilização de heparina, também foi observada em outro estudo (TALON *et al.*, 1997). Nesse trabalho ficou evidente que a redução da resposta contrátil induzida pela cafeína foi oriunda do efeito inibitório da heparina sobre as proteínas do sistema contrátil (TALON *et al.*, 1997).

Assim, o efeito inibitório da heparina sobre a maquinaria contrátil não explica a marcante inibição promovida por esse composto sobre a contração induzida pelo eugenol (Figura 30).

Portanto, os nossos resultados sugerem que a contração muscular induzida pelo eugenol ocorre por meio de uma via sensível a heparina e que, provavelmente, envolve os receptores para InsP_3 , uma vez que tais estruturas estão presentes em células musculares estriadas esqueléticas (ROJAS E HIDALGI, 1990; MEAD e WILLIAMS, 2002; SALANOVA *et al.*, 2002).

Contudo, um efeito direto do eugenol nos canais liberadores de cálcio/receptores RyR não pode ser descartado, uma vez que o bloqueio da contração muscular induzida pela heparina não foi completo (Figura 30).

Os resultados obtidos com a rianodina (Figura 23), um clássico antagonista dos canais de cálcio/receptores RyR (CORONADO, 1994; GONZALES e CAPUTO, 1996; ZUCHI e RONCA-TESTONI, 1997; FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; COLLET e JACQUEMOND, 2002), em feixes de fibras intactas demonstram que, esse composto aboliu completamente a contração induzida pela cafeína (10 mM) e pelo eugenol (10 mM).

Entretanto, antes de se observar o bloqueio da contração muscular, a rianodina induziu contração sustentada (Figura 23). Estudos demonstram que a rianodina, quando empregada em concentrações na ordem de 100 μM e em meio contendo cálcio, induz primariamente abertura do canal de cálcio do RS (receptor RyR), promovendo assim a liberação de Ca^{2+} e contração muscular (HWANG *et al.*, 1987). Este alcalóide induz, posteriormente, o bloqueio da atividade dos canais liberadores de cálcio/receptores RyR, que resulta em bloqueio tanto da contração induzida por despolarização quanto por diferentes antagonistas (LAMB e STEPHENSON, 1990; GARCIA *et al.*, 1991; OYAMADA *et al.*, 1993).

Assim, como a rianodina bloqueou a contração de fibras intactas de anfíbios induzida pelo eugenol bem como pela cafeína, isso sugeriu que os efeitos do eugenol são decorrentes da ação deste composto nos canais de cálcio (receptores RyR) presentes na cisterna terminal do RS.

Como a atividade da rianodina é dependente da concentração citoplasmática de íons cálcio (LAMB e STEPHENSON, 1990), avaliamos os efeitos desse alcalóide em preparações de fibra muscular permeabilizada, pois o emprego dessa técnica permite manter sob controle a concentração deste íon.

Mantendo-se a concentração de íons cálcio em valores menores do que 10^{-8}M , verificamos que a rianodina não induziu a liberação de íons cálcio do RS (Figura 29). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Lamb e Stephenson (LAMB e STEPHENSON, 1990), que demonstram que nessa concentração de íons cálcio a rianodina não induz a liberação desse íon do retículo sarcoplasmático.

Por outro lado, a rianodina bloqueou totalmente a contração promovida pela cafeína e, parcialmente, a contração induzida pelo eugenol (Figura 29). Como nessa preparação a única fonte de íons cálcio é o RS, isso sugere que o efeito indutor de contração do eugenol é devido a liberação de íons cálcio do RS.

Estes dados confirmam aqueles obtidos em células musculares intactas e reforçam as evidências de que a contração muscular induzida pelo eugenol é decorrente da abertura de canais de cálcio sensíveis a rianodina, presentes na membrana do retículo sarcoplasmático. Como as contrações induzidas pelo eugenol, em fibras permeabilizadas com saponina, foram parcialmente bloqueadas pela rianodina (Figura 29) e também pela heparina (Figura 30), isso sugere que o eugenol induz a liberação de íons cálcio por duas vias: uma através dos receptores da rianodina e outra mediante a abertura de canais sensíveis à heparina, este último provavelmente mediado pelo InsP_3 . Estes resultados demonstram, pela primeira vez, a existência de um composto, que não o próprio InsP_3 , capaz de ativar a liberação de cálcio por meio dos receptores InsP_3 presentes no RS.

Estudos adicionais utilizando outros antagonistas dos canais liberadores de cálcio do RS, tais como dantrolene, vermelho de rutênio e neomicina, foram de suma importância para averiguarmos a possibilidade da ação do eugenol na liberação de íons Ca^{2+} do RS citada anteriormente.

Em experimentos com fibras intactas foi demonstrado que o dantrolene foi eficiente em bloquear a contração muscular induzida pelo eugenol (Figura 24). Outros estudos demonstraram que esse composto tem a propriedade de bloquear a contração de músculo esquelético promovida pela cafeína (HARRISON, 1975; DANKO, 1985).

O completo bloqueio realizado pelo dantrolene na contração induzida pelo eugenol em fibras intactas (Figura 24) corrobora a hipótese das duas vias anteriormente citadas, uma vez que estudos realizados por Lopez e Terzic (LOPEZ e TERZIC, 1996) demonstraram que esse composto é capaz de bloquear a contração induzida pela microinjeção de InsP_3 em fibras intactas de rã (*Rana temporaria*) e outros estudos sugerem que esse antagonista promove bloqueio da liberação de cálcio através dos receptores RyR (FRUEN, 1997).

O vermelho de rutênio não foi empregado em fibras intactas pois esse composto apresenta elevada massa molecular e baixa solubilidade nas membranas biológicas dificultando assim sua passagem para o meio intracelular (HOWEL, 1974). Os estudos com células intactas são realizadas por meio de microinjeções (BAYLOR et al, 1989), procedimento esse que não foi realizado durante a realização desse trabalho.

Os resultados obtidos em fibras permeabilizadas com saponina (Figura 28) após carregamento do RS com cálcio e incubação com vermelho de rutênio evidenciaram um completo bloqueio da contração promovida tanto pela cafeína quanto pelo eugenol.

O bloqueio completo para a contração induzida pela cafeína reside no fato que o vermelho de rutênio apresenta efeito marcante de bloqueio sobre os receptores RyR (MA, 1993; XU *et al.*, 1999), que representam o local de ação para o agonista cafeína (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; HUNG, 1998).

Para o eugenol, a completa inibição de contração após incubação com o vermelho de rutênio estaria, provavelmente, vinculada ao duplo efeito de bloqueio promovido por esse antagonista. Ou seja, estudos realizados por Watras e Benevolensky (WATRAS e BENEVOLENSKY, 1987), sugerem que o vermelho de rutênio promove bloqueio da liberação de íons cálcio induzido pelo InsP_3 em músculo esquelético, atuando, provavelmente, via receptores- InsP_3 . E também promove bloqueio da liberação de íons cálcio por meio dos receptores RyR (MA, 1993; ZUCHI e RONCA-TESTONI, 1997)

A neomicina, um inibidor da contração induzida pela cafeína (PALADE, 1987) demonstrou ser capaz de promover bloqueio da contração muscular induzida pelo eugenol em fibras permeabilizadas por saponina (Figura 27). Esse bloqueio pode ser explicado pelo efeito da neomicina tanto nos receptores rianodínicos (MEISSNER e HENDERSON, 1987; SAYERS e MICHELANGELI, 1993) quanto em uma via sensível ao InsP_3 , uma vez que estudos utilizando microsossomos isolados sugerem que essa poliamina é capaz de inibir a liberação de íons Ca^{2+} induzida pelo InsP_3 (SAYERS e MICHELANGELI, 1993).

Os resultados obtidos com vermelho de rutênio bem como com a neomicina, também, corroboram a hipótese de que o eugenol atuaria liberando íons cálcio do RS, provavelmente, por uma via através dos receptores da rianodina e outra mediante a abertura de canais sensíveis a heparina, este último provavelmente mediado pelo InsP_3 .

Os nossos resultados permiti-nos sumarizar que o eugenol não induz contração tanto em fibras intactas quanto em permeabilizadas por meio de seu efeito sobre o potencial de membrana bem como no sensor de voltagem e também por alterar a sensibilidade da maquinaria contrátil ao cálcio ou a cooperatividade do mesmo. Contudo, nós temos evidências que apontam para um efeito via liberação de cálcio do RS em músculo esquelético por meio da ativação dos receptores RyR. E o efeito do eugenol na liberação de cálcio do RS também envolve uma intrigante via sensível a heparina.

Por essa razão nós acreditamos que o eugenol possa ser uma nova e interessante ferramenta para investigar os efeitos da heparina e do InsP_3 no mecanismo de AEC em músculo estriado esquelético.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que em músculo estriado esquelético intacto de anfíbio (sartório e peitoral abdominal) :

- 1) o eugenol induz contração por meio da liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático
- 2) essa contração foi bloqueada por antagonistas de canais de Ca^{2+} (rianodina e dantrolene). Contudo, o efeito indutor da contração parece ser diferente ao da cafeína, visto que a tetracaína e a procaína não bloquearam a contração induzida pelo eugenol.

Em preparações permeabilizadas por Triton X 100 ou saponina, verificou-se que:

- 1) O efeito do eugenol não é devido a sua ação direta no sistema contrátil, pois esse composto não induziu contração *per se* em fibras permeabilizadas pelo uso de Triton X 100 e não afetou a sensibilidade e a cooperatividade do sistema contrátil nessa mesma preparação.
- 2) O eugenol promoveu liberação de íons cálcio do RS.
- 3) Essa liberação envolve, provavelmente, uma via modulada pelos receptores rianodínicos (RyR), visto que foi bloqueada pela rianodina, vermelho de rutênio e neomicina. Nossos resultados mostram também evidências da participação de uma via sensível a heparina, sugerindo o envolvimento dos receptores InsP_3 .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, B. A.; TANABE, T. ; MIKAMI, A.; NUMA, S. ; BEAM, K. G. Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs. **Nature**, v.346, p. 569-572, 1990.

ADRIAN, R. H.; CHANDLER, W. K.; RAKOWSKI, R. F. Charge movement and mechanical repriming in skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 254, n. 2, p. 361-388, 1976.

AHERN, C. A.; ARIKKATH, J.; VALLEJO, P.; GURNETT, C. A.; POWERS, P. A.; CAMPBELL, K. P.; CORONADO, R. Intramembrane charge movements and excitation-contraction coupling expressed by two-domain fragments of the Ca^{2+} channel. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 98, p. 6935-6940, 2001a.

AHERN, C. A.; BHATTACHARYA, D.; MORTENSONSON, L.; CORONADO, R. A component of excitation-contraction coupling triggered in the absence of the T671-L690 and L720-Q765 regions of the II-III loop of the dihydropyridine receptor alpha (1s) pore subunit. **Biophys. Journal**, v. 81, p. 3294-3307, 2001b.

AIREY, J.A.; BECK, C.F.; MURAKAMI, K.; TANKSLEY, S.J.; DEERINCK, T.J.; ELLISMAN, M.H.; SUTKO, J.L. Identification and localization of two triad junctional foot protein isoforms in mature avian fast twitch skeletal muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 14187-14194, 1990.

ALBERTS, B; BRAY, D.; LEWIS, J. MARTIN, R. ; ROBERTS, K. ; WATSON, J.D. The Cytoskeleton. In:_____ **Molecular Biology of the Cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, Inc., p. 847-857, 1994.

ALBUQUERQUE, A. A. ; SORENSON, A. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. effects of essential oil of *Cton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscle. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 41-49, 1995.

ALMERS, W.; BEST, P. M. Effects of tetracaine on displacement currents and contraction of frog skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 262, n. 3, p. 583-611, 1976.

ANDERSON, K. F. A.; LAI, Q. Y.; LIU, E. ROUSSEAU, H. P.; MEISSNER, G. Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor- Ca^{+2} release channel complex. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 1329-1335, 1989.

ANDREWS M. A.; MAUGHAN, D. W.; NOSEK, T. M.; GODT, R. E. Ion-specific and general ionic effects on contraction of skinned fast-twitch skeletal muscle from the rabbit. **J. Gen. Physiol.**, v. 98, n.6, p. 1105-1125, 1991.

ANTONIU, B.; KIM, D. H.; MORII, M.; IKEMOTO, N. Inhibitors of Ca^{2+} release from the isolated sarcoplasmic reticulum: I—Ca channel blockers. **Biochim. Biophys. Acta** , v. 816, p. 9-17, 1985.

ARAYA, R.; LIBERONA, J. L.; CÁRDENAS, C.; RIVEROS, N.; ESTRADA, M.; POWELL, J. A.; CARRACO, M. A.; JAIMOVICH, E. Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP_3R -mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. **J. General Physiology**, v. 121, p. 3-16, 2003.

ASHLEY, C. C.; MULLIGAN, I. P.; LEA, T. J. ASHLEY, C.C.; MULLIGAN, I.P.; LEA, T.J. Ca^{+2} and activation mechanism in skeletal muscle. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 24, n. 1, p. 1-73, 1991.

AXELSON, J.; THESLEFF, S. Activation of the contractile mechanism in striated muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 44, p. 55-66, 1958.

BAYLOR, S. M.; CHANDLER, W. K.; MARSHALL, M. W. Optical measurements of intracellular pH and magnesium in frog skeletal muscle fibres. **J. Physiology**, v. 331, p. 105-137, 1982.

BAYLOR, S. M.; HOLLINGWORTH, S.; MARSHALL, M. V. Effects of intracellular ruthenium red on excitation-contraction coupling in intact frog skeletal muscle fibers. **The Journal Of Physiology**, v. 408, p. 617-635, 1989

BEAM, K. G.; KNUDSON, C. M.; POWELL, J. A. A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells. **Nature**, v. 320, p. 168-170, 1986.

BERS, D. M. Calcium fluxes involved in control of Cardiac Myocyte contraction. **Circulation Research**, v. 87, p. 275-281, 2000.

BEZANILLA, F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 555-592, 2000.

BEZPROZYANNY, I. B.; ONDRIAS, K.; KAFTAN, E.; STOYANOVSKY, D. A.; EHRLICH, B. E. Activation of the calcium release channel (ryanodine receptor) by heparin and other polyanions is calcium dependent. **Mol. Biol. Cell.**,v. 4, p. 347-352, 1993.

BIANCHI, C. P. Conformation state of the ryanodine receptor and functional effects of ryanodine on skeletal muscle. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, p. 909-912, 1997.

BIANCHI, C. P. Pharmacological actions on excitation-contraction coupling in striated muscle. **Fed. Proc.**, v. 27, n. 1, p. 126-131, 1968.

BILMEN, J.; MICHELANGELI, F. Inhibition of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by 2-aminoetoxydiphenylborate. **Cellular Signalling**, v. 14, p. 955-950, 2002.

BLOCK, B.A.; IMAGAWA, T.; CAMPBELL, K.P.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. Structural evidence for direct interaction between the components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in the skeletal muscle. **J. Cell Biol.**, n. 107, p. 2587-2600, 1988.

BRICKLEY, K. ; CAMPBELL, V.; BERROW, N.; LEACH, R.; NORMAN, R. I.; WRAY, D. Use of site-directed antibodies to probe the topography of the alpha (2) subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels. **FEBS Letters**, v. 364, p. 129-133, 1995.

BRILLANTES, A. M. B.; ONDRIAS, K.; SCOTT, A.; KOBRINSKY, E.; ONDRIASOVA, E.; MOSCHELLA, M. C.; JAYARAMAN, T.; LANDERS, M.; EHRLICH, B. E.; MARKS, A. R. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding proteins. **Cell**, v. 77, p. 513. 1994.

BRODIN P.; RHOED, A. Effects of eugenol on rat phrenic nerve and phrenic nerve-diaphragm preparations. **Arch Oral Biology**, v. 29, n.8, p. 611-615, 1984.

BRUM, G.; STEFANI, E.; RIOS, E. Simultaneous measurements of Ca^{+2} currents and intracellular Ca^{+2} concentration in single skeletal muscle fibers of the frog. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 65, p.681-685, 1987.

BRUNDER, D. G.; DETTBARN, C.; PALADE, P. T. Heavy metal-induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 18785-18792, 1988.

BURTON, T. C. Phylogenetic and functional significance of cutaneous muscles in microhylid frogs. **Herpetologica**, v. 36, n. 3, p. 256-264, 1980.

CALVIELLO, G.; CHIESI, M. Rapid kinetic analysis of the calcium-release channels of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: the effect of inhibitors. **Biochemistry**, v. 28, p. 1301-1306, 1989.

CAMPBELL, K. P.; KNUDSON, C. M.; IMAGAWA, T.; LEUNG, A. T.; SUTKO, J. L.; KAHL, S. D.; RAAB, C. R.; MADSON, L. Identification and characterization of the high affinity [^3H]Ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 6460-6463, 1987.

CAPUTO C.; BOLÃÑOS P. Contractile inactivation in frog skeletal muscle fibers: the effects of low calcium, tetracaine, dantrolene D-600, and nifedine. **J. Gen. Physiol.**, v. 86, p. 421-442, 1987.

CAPUTO, C. Caffeine and Potassium-Induced Contractures of Frog Striated Muscle Fibers in Hypertonic Solutions. **The Journal Of General Physiology**, v. 50, p. 129-139, 1966.

CAPUTO, C. The effect of caffeine and tetracaine on the time course of potassium contractures of single muscle fibres. **J. Physiology**, v. 255, n.1, p. 191-207, 1976.

CARLINI, E. A.; OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, G. G. Psychopharmacological effects of the essential oil fraction and of the hydrolate obtained from the seed of *Licaria puchury-major*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 8, n.2, p. 225-236, 1983.

CASELLA, J.F.; CRAIG, S.W.; MAAK, D.J.; BROWN, A.E. Cap Z, a barbed end actin-capping protein, is a component of the Z-line of skeletal muscle. **J. Cell Biol.**, v.105, p.371-379, 1987.

CATINOT, M- P.; BASTIDE, B.; SUAREZ-KURTZ, G.; MOUNIER, Y. Uridine triphosphate-sensitive pathway of Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibers. **European Journal of Pharmacology**, v. 362, p. 221-227, 1998.

CHALOVICH, J. M. Regulation of striated muscle contraction: a discussion. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 22, p. 1-9, 2002.

CHALOVICH, J.M. Actin mediated regulation of muscle contraction. **Pharmac. Ther.**, v. 55. P. 95-148, 1992.

CHANDLER, W. K.; RAKOWSKI, R. F.; SCHNEIDER, M. F. Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle. **J. Physiol.**, v. 254, p. 285-316, 1976.

CHAWLA, S.; SKEPPER, J. N.; HOCKADAY, A. R.; HUANG, C. L. H. Calcium waves induced by hypertonic solutions in intact frog skeletal muscle fibres. **Journal of Physiology**, v. 536.2, p. 351-359, 2001.

CHU, A., DIAZ-MUNOZ, M., HAWKES, M. J., BRUSH, K., HAMILTON, S. L. Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. **Mol. Pharmacol.**, v. 37, p. 735-741, 1990.

COELHO-DE-SOUZA, A. N. **Estudo dos efeitos do óleo essencial do *Crótonele zehntneri* e de seus principais constituintes, anetol e estragol, sobre parâmetros contráteis de músculo liso.** Fortaleza, 1997. Tese (Doutorado em Fisiologia e Farmacologia)- Universidade Federal do Ceará.

COGNARD, C.; RIVET, M.; RAYMOND, G. The blockade of excitation/contraction coupling by nifedipine in patch-clamped rat skeletal muscle cells in culture. **Pfugers Arc**, v. 416, p. 98-105, 1991.

COGNARD, C.; ROMEY, G. ; GALIZZI, J. P.; FOSSET, M.; LAZDUNSKI, M. Dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels in mammalian skeletal cells in culture: electrophysiological properties and interactions with Ca^{2+} channels activator (Bay K8644) and inhibitor (PN 200-100). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 1518-1522, 1986.

COLLET, C; JACQUEMOND, V. Sustained release of calcium elicited by membrane depolarization in ryanodine-injected mouse skeletal muscle fibers. **Biophysical Journal**, v. 82, p. 1509-1523, 2002.

COLLINS, J. H.; ELZINGA, M. The primary structure of actin from rabbit skeletal muscle. **J. Biol. Chem**, n. 250, p. 5915-5920, 1975.

CONTI, A.; GORZA, L.; SORRENTINO, V. Differential distribution of ryanodine receptor-type 3 (ryr3) gene- product in mammalian skeletal-muscles. **Biochem. J.**, v.316, p. 595-600, 1996.

COOKE, R. Actomyosin Interaction in striated muscle. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, 1997.

CORONADO, R.; MORRISSETTE, J.; SUKHAREVA, M.; VAUGHAN, D. M. Structure and function of ryanodine receptors. **Am. Journal Physiol.**, v. 266, p. C1485-C1504, 1994.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. ^a ; ALENCAR, J. W. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. **Ciência e Cultura**, v. 29, suppl. 455, 1977.

CRIDDLE, D. N.; MADEIRA, S. V.; SOARES de MOURA, R. Endothelium-dependent and -independent vasodilator effects of eugenol in rat mesenteric vascular bed. **J. Pharm. Pharmacol.** , v. 55, n. 3, p. 359-365, 2003.

CSERNOCH, L.; SZENTESI, P.; SÁRKÖZI, S.; SZEGEDI, C.; JONA, I.; KOVÁCS, L. Effects of tetracaine on sarcoplasmic calcium release in mammalian skeletal muscle fibres. **Journal of Physiology**, v. 515.3, p. 843-857, 1999.

CURTIS, B. M.; CATERRALL, W. A. Purification of calcium antagonist receptor of the voltage sensitive calcium channel from skeletal transverse tubules. **Biochemistry**, v. 23, p. 2113-2118, 1984.

DALLMEIER-ZELGER, K. R.; ZELGER, J. L.; CARLINI, E.A. New anticonvulsants derived from 4-allyl-2-methoxyphenol (Eugenol) comparison with common antiepileptics in mice. **Pharmacology**, v.27, n.1, p. 40-49, 1983.

DAMIANI, C.E.N. **Efeitos do eugenol, um óleo essencial, sobre as atividades mecânicas e elétricas de músculo estriado cardíaco e liso vascular de rato.** Vitória, 2003. 203f. Tese (Doutorado em Fisiologia-Fisiologia Cardiovascular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo.

DAMIANI, C.E.N.; ROSSONI, L.V.; VASSALO, D. V. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. **Vascular Pharmacology**, v. 60, p.1-8, 2003.

DANKO, S.; KIM, D. H.; SRETER, F. A.; IKEMOTO, N. Inhibitors of Ca^{2+} release from the isolated sarcoplasmic reticulum . The effects of dantrolene on Ca^{2+} release induced by caffeine, Ca^{2+} and depolarization. **Biochim Biophys Acta**, v. 816, p. 18-24, 1985.

De JONGH, K. S.; WARNER, C.; CATERRAL, W. A. Subunits of purified calcium channels- α -2 and delta are encoded by the same gene. **Journal Biol. Chem.**, v. 265, p. 14738-14741, 1990.

DEHPOUR, A. R.; MOFAKRAM, S.; MAHMOUDIAN, M. *In vitro* binding of dantrolene to sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. **Biochemical Pharmacology**, v. 31, n. 6, p. 965-968, 1982.

DENBOROUGH, M. Malignant hyperthermia. **The Lancet**, v.352, p. 1131-1136, 1998.

DIETZE, B.; BERTOCCHINI, F.; BARONE, V.; STRUK, A.; SORRENTINO, V.; MELZER, V. Voltage-controlled Ca^{2+} release in normal and ryanodine receptor type 3 (RyR3)-deficient mouse myotubes. **J. Physiol.**, v. 513, p. 3-9, 1998.

DONALDSON, S. K.; GOLDBERG, N. D.; WALSETH, T. F.; HUETTEMAN, D. A. Inositol 1,4,5-triphosphate induces force generation of peeled skeletal muscle fibers at 10^{-3} M free Mg^{++} , **Biophys. J.**, v. 49, 191a, 1986.

DUKE, A. M.; STELLE, D. S. Characteristics of phosphate-induced Ca^{2+} efflux from the SR in mechanically skinned rat skeletal muscle fibers. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 278, p. 126-135, 2000.

DULHUNTY, A. F., GAGE, P. W. Effects of extracellular calcium concentration and dihydropyridines on contraction in mammalian skeletal muscle. **Journal Physiology**, v. 399, p.63-80, 1988.

DULHUNTY, A. F.; HAARMANN, C. S.; GREEN, D.; LAVER, D. R.; BOARD, P. G.; CASAROTO, M. G. Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 79, p. 45-75, 2002.

EBASHI, S. Regulation of muscle contraction. **Proc. R. Soc. Ser. B.**, n. 207, p. 256-286, 1980.

EI-HAYEK, R.; ANTONIU, B.; WANG, J.; HAMILTON, S. L.; IKEMOTO, N. Identification of calcium release-triggering and blocking regions of the II-III loop of skeletal muscle dihydropyridine receptor. **Journal Biol. Chem.**, v. 270, p. 22116-22118, 1995.

ELLIS, K. O. ; BRYANT, S. H. Excitation-contraction uncoupling in skeletal muscle by dantrolene sodium. **Arch Exp Pathol Pharmacol**, v. 86, p. 107-109, 1972.

EL-SALEH, S.C. ; POTTER, J. D.; SOLARO, R. J. Alteration of actin-tropomyosin in 2,4-pentanedione-treated rabbit skeletal myofibrils. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 31, p. 14646-14650, 1986.

ENDO, M. Calcium release from sarcoplasmic reticulum. **Curr. Top. Membr. Transp.**, v. 25, p. 181-230, 1985.

ENDO, M. Calcium release from sarcoplasmic reticulum. **Physiol. Rev.**, v. 57, p. 71-108, 1977.

ENDO, M. Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 51, p. 479-484, 1975.

ENDO, M.; TANAKA, M.; OGAWA, Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. **Nature**, v. 228, p. 34-36, 1970.

ESTRADA, M.; CÁRDENAS, C.; LIBERONA, J. L.; CARRACO, M. A.; MIGNERY, G. A.; ALLEN, P. D. Calcium transients in 1B5myotubes lacking ryanodine receptors are related to inositol trisphosphate receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22868-22874, 2001.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. **Am. Journal Physiol.**, v.245, p. 1-14, 1983.

FABIATO, A. Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. **J. Gen. Physiol.**, v. 85, p.291-320, 1985.

FANO, G.; BELIA, S.; FULLE, S.; ANGELELLA, P.; PANARA, F.; MARSILI, V.; PASCOLINI, R. Functional aspects of calcium transport in sarcoplasmic reticulum vesicles derived from frog skeletal muscle treated with saponin. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v. 10, n. 4, p. 326-330, 1989.

FEINSTEIN, M. B. Inhibition of caffeine rigor and radiocalcium movements by local anesthetics in frog sartorius muscle. **J. Gen. Physiol.**, v. 47, p. 151-171, 1963.

FELDER, E.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 99, p. 1696-1700, 2002.

FILL, M. D.; BEST, M. P. block of contracture in skinned frog skeletal muscle fibers by calcium antagonists. **J. Gen. Physiol.**, v. 93, p. 429-449, 1989.

FILL, M.; COPELLO, A. Ryanodine receptor calcium release Channels. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 893-922, 2002.

FINCH, E. A.; TURNER, T. J.; GODIN, S. M. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-triphosphate induced calcium release. **Science**, v. 252, p. 443-446, 1991.

FITTS, R.H.; MEZTGER, J. M. Mechanisms of muscular fatigue. In:_____ **Principle of exercise biochemistry**. Karger: Basel, v.27. p. 121-229, 1988.

FLEISCHER, S.; OGUNBUNM, E. M.; DIXON, M. C.; FLERR, E. A. M. Localization of Ca^{2+} release channel with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 82, p. 7256-7259, 1985.

FLORIO, V. STRIESSING, J., CATERRALL, W. A. Purification and reconstitution of skeletal muscle calcium channels. **Methods Enzymol.**, v. 207, p. 529-546, 1992

FOGAÇA, R. T. H.; CAVALCANTE, A. D. A.; SERPA, A. K. L.; SOUSA, P. J. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. The effects of essential oil of *mentha x villosa* on skeletal muscle of the toad. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 552-557, 1997.

FORD, L. E.; PODOLSKY, R. J. Regenerative calcium release within muscle cells. **Science**, v. 167, p. 58-59, 1970.

FRANCOIS, J.M.; SHENG, Z.; SZCZESNA, D.; PTTER, J.D. The functional role of the domains of troponin-C investigated with thrombin fragments of troponin-C reconstituted into skinned muscle fibers. **J. Biol. Chem.**, v.270:33, p. 19287-19293, 1995.

FRANK, G. B. Dihydropyridine calcium channel antagonists block and agonists potentiate high potassium contractures but not twitches in frog skeletal muscle. **Jpn J. Physiol.**, v. 40, n.2, p. 205-224, 1990.

FRANZI-ARMSTRONG, C. The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. **FASEB J**, v. 13, p. 266-270, 1999.

FRANZINI-ARMSTRONG, C., PROTASI, F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. **Physiological Reviews**, v.77, n.3, p. 699-729, 1997.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; JORGENSEN, A. O. Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 56, p. 509-534, 1994.

FRUEN, B. R.; MICKELSON, J. R.; LOUIS, C. F. Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 43, p. 26965-26971, 1997.

FRYER, M. W.; LAMB, G. D.; NEERING, I. R. The action of ryanodine on rat fast and slow intact skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 414, p. 399-413, 1989.

FUTATSUGI, A.; KATO, K.; OGURA, H.; LI, S. T.; KUWAJIMA, K.; TANAKA, K.; ITOHARA, S.; MIKOSHIBA, K. Facilitation of NMDAR-independent LTD and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. **Neuron**, v. 24, n. 3, p. 701-713, 1999.

GAO, L.; BALSHAW, D.; XU, L.; TRIPATHY, A.; XIN, C.; MEISSNER, G. Evidence for a role of the lumenal M3-M4 loop in skeletal muscle Ca^{2+} release channel (Ryanodine receptor) activity and conductance. **Biophysical Journal**, v. 79, p. 828-840, 2000.

GARCIA J.; AVILA-SAKAR, A. J.; STEFANI, E. Differential effects of ryanodine and tetracaine on charge movement and calcium transients in frog skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 440, p. 403-417, 1991.

GARCÍA, J.; SCHNEIDER, M. F. Suppression of calcium release by calcium or procaine in voltage clamped rat skeletal muscle fibres. **Journal of Physiology**, v. 485.2, p. 437-445, 1995.

GARCIA, M. C.; ESCAMILLA-SÁNCHEZ, J. Positive inotropic effect of adrenaline on potassium contractures in tonic muscle fibres of frog. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 74, p. 1580-1585, 1994.

GARRETT, R. H. ; GRISHAN, C. M. Muscle contraction. In:_____ **Molecular Aspects of Cell Biology**. Orlando: Saunders College Publishing, 1995. p. 1156-1176.

GEORGE, L.L.; ALVES, C.E.R.; CASTRO, R.R.L. Tecido Muscular. In:_____ **Histologia Comparada**. São Paulo: ROCA, 1998. p. 67-74.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MAZZANTI, G. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essentials oils. **Planta Medica**, v. 67, p. 564-566, 2001.

GODT, R. E.; FOGAÇA, R.T.H.; NOSEK, T. M. Changes in force and calcium sensitivity in the developing avian heart. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 69, 1692-1697, 1991.

GODT, R. E.; LINDLEY, B. D. Influence of temperature upon contractile activation and isometric force production in mechanically skinned muscle fibers of the frog. **J. Gen. Physiol.**, v. 80, p. 279-297, 1982.

GOLDMAN, Y.E.; BRENNER, B. Special topic: Molecular Mechanism of muscle contraction. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 49, p. 629-635, 1987.

GONZALES, A.; CAPUTO, C. Ryanodine interferes with charge movement repriming in amphibian skeletal muscle fibers. **Biophysical Journal**, v. 70, p. 376-382, 1996.

GORDON, A. M; H. Regulation of Contraction in Striated Muscle. *Physiological Reviews*, vol. 80, n.2, p. 853-924, 2000.

GRABAREK, Z.; DRABIKOWSKI, W.; LEAVIS, P.C.; ROSENFELD, S.S.; GERGELY, J. Proteolytic fragments of troponin C. Interactions with the other troponin subunits and biological activity. **J Biol Chem** 256:24, p.13121-13127, 1981.

GREGG, R. G.; MESSING, A.; STRUBES, C.; BEURGE, M; , MOSS, R.; BEHAN, M.; SUKHAREVA, M.; HAYNES, S.; POWELL, J. A.; CORONADO, R.; POWERS, P. Absence of the β subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the $\alpha 1$ subunit and eliminates excitation-contraction coupling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 13961-13966, 1996.

GROVE, B.K.; KURER, V.; LEHNER, C.; DOETSCHMAN, T.C.; PERRIARD, J.C.; EPPENBERGER, H.M. A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. **J. Cell Biol.** , v.98, p. 518-524, 1984.

GUEDES, R. A.; ALVES, M. S. L.; KANIAK R. F. B.; MONTEIRO, V. G., FOGAÇA, R. T. H.; Efeitos do anetol e da cafeína nos mecanismos de captação e liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático de célula muscular esquelética de anfíbio. In. 7º Evinci, 1999, Curitiba. **Anais**. Editora Universidade Federal do Paraná, p. 116, 1999.

GURNETT, C. A.; De WAARD, M.; CAMPBELL, K. P. Dual function of the voltage-dependent Ca^{2+} channels $\alpha(2)\delta$ subunit in current stimulation and subunit interaction. **Neuron.**, v. 16, p. 431-440, 1996.

GUSE, A. H., da SILVA, C. P.; BERG, I.; SKAPENKO, A. L.; WEBER, K.; HEYER, P.; HOHENEGGER, M.; ASHAMU, G. A.; SCHULZER-KOOPS, H.; POTTER, B. V.; MAYR, G. W. Regulation of calcium signaling in T lymphocytes by second messenger cyclic ADP-ribose. **Nature**, v. 398, p. 70-73, 1999.

HAKAMATA, Y. NAKAI, J. TAKESHIMA, H.; IMOTO, K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/ calcium release channel from rabbit brain. **FEBS Lett.**, v. 312, p. 229-235, 1992.

HAROOTUNIAN, A. T., KAO, J. P. Y., PARANJAPE, S.; ADAMS, S. R.; POTTER, B.V.; TSIEN, R.Y. Ca^{+2} oscillations in REF52 fibroblasts- Ca^{+2} -stimulated IP_3 production or voltage-dependent Ca^{+2} channels as key positive feedback elements. **Cell Calcium**, v. 12, p. 153-164, 1991.

HARRINGTON, W.F.; RODGERS, M. Myosin. **Ann, Rev. Biochem.**, v. 53, p-35-73, 1984.

HARRISON, G. G. ; Control of malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. **Br. Journal Anaesth**, v. 47, p. 62-65, 1975.

HERBETTE, L.; MESSINEO, F. C.; KATZ, A. M. The interaction of drugs with the sarcoplasmic reticulum. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 22, p. 413-434, 1982.

HERRMANN-FRANK, A., LÜTTGAU, H. C.; STEPHENSON, D. G. Caffeine and excitation-contraction coupling in skeletal muscle: a stimulating story. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 20, p. 223-327, 1999.

HIBBERT, M.G.; TRENTAN, D.R. Relationships between chemical and mechanical events during muscular contraction. **Ann Rev. Biophys. Biophys. Chem.**, v. 15, p. 116-161, 1989.

HILLE, B. Sensory transduction, salt transport, calcium release, and intercellular coupling. In: _____ **Ionic Channels of Excitable Membranes**. Massachusetts: Sinauer Associates INC., 1992 p. 202-235.

HOWEL, J. N. Intracellular binding of ruthenium red in frog skeletal muscle. **The Journal of Cell Biology**, v. 62, p. 242-247, 1974

HUANG, C. L. Voltage-dependent block of charge movement components by nifedipine in frog skeletal muscle. **J. Gen. Physiol.**, v. 96, p. 535 – 557, 1990.

HUANG, C. L. H. The influence of caffeine on intramembrane charge movements in intact frog striated muscle. **Journal of Physiology**, v. 512.3, p. 707-721, 1998.

HUME, W. R. Effect of eugenol on constrictor responses in blood vessels of the rabbit ear. **Journal of Dental Research**, v. 62, n.9, p. 1013-1015.

HUXLEY, A.F. Muscle structure and theories of contraction. **Prog. Biophys. Biophys. Chem.**, v.7, p.255-318, 1957.

HUXLEY, A.F.; NIEDERGERKE, R. Interference microscopy of living muscle fibres. **Nature**, v. 173, p. 971-973, 1954.

HUXLEY, S.A.; **Reflections on muscle**. Liverpool University Press, 1980, p. 1-111.

HUXLEY; H. E. ; HANSON, J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. **Nature** v. 173, p. 973-976, 1954.

HYMEL, L.; INUI, M.; FLEISCHER, S.; SCHINDLER, H. Purified ryanodine receptor of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum forms Ca^{2+} -activated oligomeric Ca^{2+} channels in planar bilayers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 441-445, 1988.

HWANG, K. S.; SAIDA, K.; BREEMEN, C. Modulation of ryanodine induced Ca^{2+} release in amphibian skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 142, n.3, 1987.

IKEMOTO, N. Structure and function of the calcium pump protein of sarcoplasmic reticulum. **Ann. Rev. Physiology**, v. 44, p. 297-317, 1982

IKEMOTO, N. B.; ANTONIU, B.; MESZAROS, L. G. Rapid flow chemical quench studies of calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 14096-14100, 1985.

IMAGAWA, T.; SMITH, J. S.; CORONADO, R.; CAMPBELL, K. P. Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} -permeable pore of the calcium release channel. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 16636-16643, 1987.

INUI, M.; FLEISCHER, S. Purification of Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) from heart and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Methods Enzymol.**, v. 157, p. 490-505, 1988.

INUI, M.; SAITO, A.; FLEISCHER, S. Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 15637-15642, 1988.

INUI, M.; SAITO, A.; FLEISCHER, S. Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 10843-10850, 1987a.

INUI, M.; WANG, S.; SAITO, A.; FLEISCHER, S. Characterization of junctional and longitudinal sarcoplasmic reticulum from heart muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 10843-10850, 1987b.

IWANE, A.H.; KITAMURA, K.; TOKUNAGA, M.; YANAGIDA, T. Myosin subfragment-1 is fully equipped with factors essential for motor function. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 230:1, p. 76-80, 1997.

JAIMOVICH, E. Chemical transmission of the triad: InsP₃? **J. Muscle Res. Cell Motility**, v. 12, p. 316-320, 1991.

JENDEN, D. J.; FAIRHURST, A. S. The pharmacology of ryanodine. **Pharmacol. Rev.**, v. 267, p. 1-25, 1969.

JEYAKUMAR, L. H.; COPELLO, J. A.; O'MALLEY, A. M.; WU, G. M.; GRASSUCCI, R.; WAGENKNECHT, T.; FLEISCHER, S. Purification and characterization of ryanodine receptor 3 from mammalian tissue. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 16011-16020, 1998.

JOHNSON, J.D.; COLLINS, J.H.; POTTER, J.D. Dansylaziridine-labeled troponin C. A fluorescent probe of Ca²⁺ binding to the Ca²⁺-specific regulatory sites. **J Biol Chem**, v. 253, n.18, p. 6451-6458, 1978.

JUNQUEIRA, L. C. ; CARNEIRO, J. Tecido Muscular. In:_____. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, 1995. p. 163

KATZ, A. M. Calcium channel diversity in the Cardiovascular System. **Journal Am. College of Cardiology**, v. 28, n. 2, p. 522-529, 1996.

KIM, D. H.; OHNISHI, S. T.; IKEMOTO, N. Kinetic studies of calcium release from sarcoplasmic reticulum in vitro. **Journal Biol. Chem.**, v. 258, p. 9662-9668, 1983.

KIM, Y. K.; CHO, H. J.; KIM, W. T.; CHO, K. S. Caffeine-and-Inositol 1,4,5-Trisphosphate-induced ⁴⁵Ca²⁺ releases in the microsomes of tracheal epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 230, p. 247-250, 1997.

KITAMURA, N.; OBA, T.; ITO, S.; NAKAZATO, Y. Effects of nifedipine and Bay K 8644 on contractile activities in single skeletal muscle fibers of the frog. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 256, n. 2, p. 169-176, 1994.

KLEIN, M.; SIMON, B. J.; SCHNEIDER, M. F. Effects of procaine and caffeine on calcium release from the sarcoplasmic reticulum in frog skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 453, p. 341-366, 1992.

KLEIN, M.G.; LACAMPAGNE, A.; SCHNEIDER, M. F. A repetitive mode of activation of discrete Ca^{+2} release events (Ca^{+2} sparks) in frog skeletal muscle fibres. **Journal of Physiology**, v. 515.2, p. 391-411, 1999.

KOBAYASHI, S.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Heparin inhibits the inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent but not the independent, calcium release induced by guanine nucleotide in vascular smooth muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 153, n. 2, p. 625-631, 1988.

KUBEBAYASHI, N.; OGAWA, Y. Calcium releasing action of quercetin on sarcoplasmic reticulum from frog skeletal muscle. **J. Biochem.**, v. 96, p. 1249-1255, 1984.

LAI, F. A.; ERICKSON, H. P.; ROUSSEAU, E.; LU, Q. Y.; MEISSNER, G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. **Nature**, v. 331, p. 315-319, 1988.

LAI, F. A.; ERICKSON, H.; BLOCK, B. A.; MEISSNER, G. Evidence for a junctional feet-ryanodine receptor complex from sarcoplasmic reticulum. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 143, p. 704-709, 1987.

LAI, F.; LIU, Q.; XU, L.; EL-HASHEM, A.; KRAMARCY, N.; SEALOCK, R.; MEISSNER, G. Amphibian ryanodine receptor isoforms are related to those of mammalian skeletal or cardiac muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 263 (Cell Physiol. 32), p. C365-372, 1992.

LAMB, G. D. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 216-224, 2000.

LAMB, G. D.; POSTERINO, G. S.; STEPHENSON, D. G. Effects of heparin on excitation-contraction coupling in skeletal muscle of toad and rat. **Journal of Physiology**, v. 474.2, p. 319-329, 1994.

LAMB, G. D.; STEPHENSON, D. G. Control of calcium release and the effect of ryanodine in skinned fibres of the toad. **Journal of Physiology**, v. 423, p. 519-542, 1990.

LAUNIKOS, B. S.; STEPHENSON, D. G. Effect of saponin treatment on the sarcoplasmic reticulum of rat, cane, toad and crustacean (yabby) skeletal muscle. **J. Physiol.**, v. 504.2, p. 425-437, 1997.

LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **An. Acad. Bras. Ciências**, v. 71, n. 2, p. 207-213, 1999.

LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; FIGUEIREDO, I. B.; MILFONT, J. M. B.; SOUZA, I. T. Benzyl-eugenol antagonizes the contracture induced by eugenol on skeletal muscle. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**, v. 28/29, p. 35-39, 1988/1989.

LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SOUZA, I. T.; FIGUEIREDO, I. M. B. Effects of Eugenol on Excitation-Contraction Coupling in Skeletal Muscle. **Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 327, n. 1, 1994.

LEAL-CARDOSO, J.H.; LAHLOU, S.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; PINTO DUARTE, G. I. ; SANTOS, M. A.; MAGALHÃES, P. J. Inhibitory actions of eugenol on rat isolated ileum. **Can J. Physiol. Pharmacol.**, v. 80, n.9, p.901-906, 2002.

LEAVIS, P.C.; GERGELY, J. Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. **CRC Crit. Rev. Biochem.**, v. 16, p. 235-305, 1984.

LEAVIS, P.C.; ROSENFELD, S.S.; GERGELY, J.; GRABAREK, Z.; DRABIKOWSKI, W. Proteolytic fragments of troponin C. Localization of high and low affinity Ca^{2+} binding sites and interactions with troponin I and troponin T. **J Biol Chem**, v.253,n.15, p. 5452-5459, 1978.

LEHMAN, W.; CRAIG, R.; VIBERT, P. Ca^{2+} -induced tropomyosin movements in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. **Nature**, v. 368, p. 65-67, 1994.

LEHMAN, W.; VIBERT, P.; UMAN, P. CRAIG, R. Steric-blocking by tropomyosin visualized in relaxed vertebrate muscle thin filaments. **Journal Mol. Biol.**, v. 251, p. 191-196, 1995.

LEHRER, S. S. The regulatory switch of the muscle thin filament: Ca^{+2} or myosin heads? **Journal of Muscle and Cell Motility**, v. 15, n. 3, p. 232-236, 1994.

LEONG, P.; MACLENNAN, D. H. Complex interactions between skeletal muscle ryanodine and dihydropyridine receptor proteins. **Biochem, Cell Biol.**, v. 76, p. 682-694, 1998.

LEONG, P.; MACLENNAN, D. H. The cytoplasmic loop between domains II and III and domains III and IV in the skeletal muscle dihydropyridine receptor bind to a contiguous site in the skeletal muscle ryanodine receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 29958-29964, 1998.

LEUNG, A. T.; IMAGAWA, T.; CAMPBELL, K. P. Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca^{2+} channel from rabbit skeletal muscle- evidence for 2 distinct high-molecular-weight subunits. **Journal Biol. Chem.**, v. 262, p. 7943-7946, 1987.

LEVITAN, I. B.; KACZMAREK, L. K. Electrical Properties of Neurons. In: _____ **The Neuron: Cell and Molecular Biology**. Oxford: Oxford University Press, 1997. p. 43-117.

LINDSAY, A. R., WILLIAMS, A. J. Functional characterization of the ryanodine receptor purified from sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1064, p. 89-102, 1991.

LOFRANO-ALVES, M. S.; SILVEIRA-GOMES, A. R.; OLIVEIRA, E. L.; PACHECO, T.; KASSOUF-SILVA, I.; FOGAÇA, R.T.H. Effects of eugenol on intact and skinned muscle fibers (SMF) of frog. In: XVI LATINAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, XXXII BRAZILIAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, II IBEROAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, VII INTERAMERICAN CONGRESS OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 2000, Águas de Lindoia. **Abstracts**. Associação Latinoamericana de Farmacologia, 2000. p. 265.

LOPEZ, J. R.; TERZIC, A. Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in regulated by cytosolic Ca^{2+} in intact skeletal muscle. **Plügers Archiv.- European Journal of Physiology**, v. 432, n. 5, p. 782-790, 1996.

LÜTGAU, H. C.; OETLIKER, H. The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibers. **Journal Physiol.**, v. 194, p. 51-74, 1968.

MA, J. Block by ruthenium red of the ryanodine-activated calcium release channel of skeletal muscle. **The Journal of General Physiology**, v. 102, p. 1031-1056, 1993.

MA, J.; CORONADO, R. Heterogeneity of conductance states in calcium channels of skeletal muscle. **Biophys. J.**, v. 53, p. 387-395, 1988.

MACK, W. M.; ZIMÁNYI, I.; PESSAH, I. N. Discrimination of multiple binding sites for antagonists of the calcium release channel complex of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 262, p. 1028-1037, 1992.

MACLENNAN, D. H.; RICE, W. J.; GREEN, N. M. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 46, p. 28815-28818, 1997.

MALNIC, B.; FARAH, C.S.; REINACH, F.C. Regulatory properties of the NH₂- and COOH-terminal domains of troponin T. ATPase activation and binding to troponin I and troponin C. **J. Biol. Chem.**, v.273,n.17, p.10594-10601, 1998.

MARBAN, E.; YAMAGISHI, T.; TOMASELLI, G. F. Structure and function of voltage-gated sodium channels. **Journal of Physiology**, v. 508.3, p. 647-657, 1998.

MARKS, A. R.; TEMPST, P.; HWANG, K. S.; TAUBMAN, M. B.; INUI, M.; CHADWICH, C., FLEISCHER, S.; NADAL-GINARD, B. Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 86, p.8683-8687, 1989.

MARKS, A.R. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. **Am. J. Physiol.**, v. 272 (Heart Circ. Physiol. 41), p. H597-H605, 1997.

MARUYAMA, K. Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. **FASEB J.**, v. 11:5, p. 341-345, 1997.

MARUYAMA, T. KANAJI, T.; NAKADE, S.; KANNO, T.; MIKOSHIBA, K. 2APB. 2-aminoethoxydiphenylborate, a membrane-penetrable modulator of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced Ca^{2+} release. **J. Biochem.**, v. 122, p. 498-505, 1997.

MARX, S. T.; ONDRIAS, K.; MARKS, A. R. Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{+2} release channels (ryanodine receptors). **Science**, v. 281, p. 818-821, 1998.

MATHIAS, R. T.; LEVIS, T. R. A.; EISENBERG, R. S. Electrical models of excitation contraction coupling and charge movement in skeletal muscle. **J. Gen. Physiol.**, v. 76, p. 1-31, 1980.

McCLESKEY, E. W. Calcium channels and intracellular calcium release are pharmacologically different in frog skeletal muscle. **J. Physiol.**, v. 361, p. 231-249, 1985.

MEAD, F.; WILLIAMS, A. J.; Block of the ryanodine receptor channel by neomycin is relieved at high holding potentials. **Biophysical Journal**, v. 82, p. 1953-1963, 2002.

MEISSNER, G. Adenine nucleotide stimulation of Ca^{+2} -induced calcium release in sarcoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v.261, p.6300-6306, 1986.

MEISSNER, G. Monovalent ion and calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum. **Mol. Cell Biocjem.**, v. 55, p. 65-82, 1983.

MEISSNER, G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 6300-6306, 1986.

MEISSNER, G. Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 56, p. 485-508, 1994.

MEISSNER, G.; HENDERSON, J. S. Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca^{2+} and is modulated by Mg^{2+} adenine nucleotide and calmodulin. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 3065-3073, 1987.

MELTZER, W.; HERRMANN-FRANK, A.; LÜTTGAU, H. CH. The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibers. **Biochimia et Biophysica Acta**, v. 1241, p. 59-116, 1995.

MENSHIKOVA, E. V.; RITOV, V. B. Release of Ca^{2+} ions from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscles after treatment with caffeine. **Biokhimiia**, v. 51, p. 603-611, 1986.

MENSHIKOVA, E. V.; RITOV, V. B.; KOZLOV, I. Release of Ca^{2+} ions from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle induced by heparin. Relation between the Ca^{2+} release caused by Ca^{2+} ions and caffeine. **Biokhimiia**, v. 51, n. 10, p. 1696-1701, 1986.

MIYAMOTO, H.; RACKER, E. Calcium-induced calcium release at terminal cisternae of skeletal sarcoplasmic reticulum. **FEBS Lett**, v. 133, n. 2, p. 235-238, 1981.

MICHALAK, M.; DUPRAZ, P.; SHOSHAN-BARMATZ, V. Ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum membrane: comparison between cardiac and skeletal muscle. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 939, p. 587-594, 1988.

MIKAMI, A.; IMOTO, K.; TANABE, T.; NIIDOME, T.; MORI, Y.; TAKESHIMA, H.; NARUMIYA, S.; NUMA, S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. **Nature**, v. 340, p. 230-233, 1989.

MILLEVOI, S.; TROBITAS, K.; KOLMERER, B.; KOSTIN, S.; SCHAPER, J.; PELIN, K.; GRANZIER, H.; LABEIT, S. Characterization of nebulin and nebulin and emerging concepts of their roles for vertebrate Z-discs. **J. Mol. Biol.**, v. 282:1, p.111-123, 1998.

MONNIER, N. PROCACCIO, V. STIEGLITZ, P. LUNARDI, J. Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 60, n.6, p. 1316-1325, 1997.

MORI, H.; TONOMURA, Y. The gating behavior of a channel for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in fragmented sarcoplasmic reticulum. **J. Biochem.**, v. 93, p. 1271-1285, 1983.

MOSS. R. L.; HOFMANN. P. A. Cellular and molecular basis of muscle contraction. **Fundamental of Medical Cell Biology**, v. 5b, p. 185-237, 1992.

MURAYAMA, T.; OGAWA, Y. Purification and characterization of two ryanodine-binding protein isoforms from sarcoplasmic reticulum of bullfrog skeletal muscle. **J. Biochem.** Tokyo, v.112, p.514-522, 1992.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.R.; MAYES, P.A; RODWELL, V.W. **Harper's Biochemistry**. 23^o edition. USA : Prentice-Hall International Inc., p. 650, 1993.

NABAUER, M. CALLEWAERT, G.; CLEEMANN, L.; MORAD, M. Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. **Science**, v. 244, p. 800-803, 1989.

NAKAI, J.; IMAGAWA, T.; HAKAMAT, Y.; SHIGEKAWA, M.; TAKESHIMA, H.; NUMA, S. Primary structure and functional expression from cDNA of cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. **FEBS Lett.**, v. 271, p. 169-177, 1990.

NAKAI, J.; TANABE, T.; KONNO, T.; ADAMS, B.; BEAM, K. G. Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. **The Journal of Biological Chemistry**, v273, n. 39, p. 24983-24986, 1998.

NELSON, D. L. ; COX, M.M. Protein Function. In: _____ **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2000. p. 238.

NEYLON, C. B.; RICHARDS, S. M.; LARSEN, M. A.; AGROTIS, A.; BOBIK, A. Multiple types of ryanodine receptor/ Ca^{+2} release channels are expressed in vascular smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commum.**, v. 215, p. 814-821, 1995.

NISHIJIMA, H.; UCHIDA R.; KAMEYAMA, K. KAWAKAMI, N.; OHKUBO, T. SHIMAMAUURA, K.; KITAMURA, K. Mechanisms mediating the vasorelaxing action of eugenol, a pungent oil, on rabbit arterial tissue. **Japanese Journal Pharmacology**, v. 79, p. 327-334, 1999.

NISHIJIMA, H.; UCHIDA R.; KAWAKAMI, N.; SHIMAMAUURA, K.; KITAMURA, K. role of endothelium and adventia on eugenol-induced relaxation of rabbit ear artery precontracted by histamine. **Journal Smooth Muscle Res.**, v. 34, p. 123-137, 1998.

NOSEK, T. M.; FOGAÇA, R. T. H.; HATCHER, C. J.; BROTTTO, M. A. P.; GODT, R. E. Effect of cardiac neural crest ablation on contractile force and calcium uptake and release in chick heart. **Am. J. Physiol.**, v. 223, p. H1464-H1471, 1997.

OBA, T. Niflumic acid differentially modulates two types of skeletal ryanodine-sensitive Ca^{+2} -relaese channels. **Am. J. Physiol.**, v. 273 (Cell Physiol. 42), p. 1588-1595, 1997.

OBA, T.; AOKI, T.; LIU, G. H.; HOTTA, K. A local anesthetic, tetracaine, similiary inhibits Ag^{+} and K^{+} contractures in frog skeletal muscle. **Jpn J Physiol.**, v. 37, p. 995-1003, 1987.

OFFER, G.; MOOS, G.; STARR, R. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils . Extraction purification and characterization. **J. Mol. Biol.**, v. 74, p. 653-676, 1973.

OGAWA, Y., AND HARAFUJI, H. Effect of temperature on [^3H]ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle. **J. Biochem.**, v. 107, p. 887-893, 1990.

OGAWA, Y.; MURAYAMA, T. FURTHER Characterization of ryanodine receptor isoforms purified from bullfrog (skeletal muscle). **Calcium as Cell Signal**, , p. 95-101, 1995.

OHTA, T.; ITO, S.; OHGA, A. Inhibitory action of dantrolene on Ca-induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig skeletal muscle. **European Journal Pharmacology**, v. 178, p. 11-19, 1990.

OHTSUKA, H.; YAJIMA, H.; MARUYAMA, K.; KIMURA, S. The N-terminal Z repeat 5 of connectin/titin binds to the C-terminal region of alpha-actinin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 235:1, p.1-3, 1997.

OLIVARES, E.B.; TANKSLEY, S.J.; AIREY, J.A.; BECK, C.F.; OUYANG, Y.; DEERINCK, T.J.; ELLISMAN, M. H.; SUTKO, J.L. Nonmammalian vertebrate skeletal muscles express two two triad junctinal foot protein isoforms. **Biophys. J.**, v. 59, p. 1153-1163, 1991.

OLIVEIRA, E. L.; LOFRANO-ALVES, M. S.; SILVEIRA-GOMES, A. R.; PACHECO, T.; KASSOUF-SILVA , I.; FOGAÇA, R. T. H. Effects of anethole and perchlorate on sartorius muscle from the frog. In: XVI LATINAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, XXXII BRAZILIAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, II IBEROAMERICAN CONGRESS OF

PHARMACOLOGY, VII INTERAMERICAN CONGRESS OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 2000, Águas de Lindoia. **Abstracts.** Associação Latinoamericana de Farmacologia, 2000. p. 265.

OTSU, K.; WILLARD, H. F.; KHANNA, V. K.; ZORZATO, F.; GREEN, N.M.; MACLENNAN, D.H. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 13472-13483, 1990.

OUYANG, Y.; MARTONE, M. E.; DEERINCK, T. J.; AIREY, J. A.; SUTKO, J. L.; ELISMAN, M. H. Differential distribution and subcellular localization of ryanodine receptor isoforms in the chicken cerebellum during development. **Brain Res.**, v. 775: 1-2, p. 52-62, 1997.

OYAMADA, H.; IINO, M.; ENDO, M. Effects of ryanodine on the properties of Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal muscle fibres of the frog. **Journal of Physiology**, v. 470, p. 335-348, 1993.

OYAMADA, H.; MURAYAMA, T.; TAKAGI, T.; IINO, M.; IWABE, N.; MIYATA, T.; OGAWA, Y.; ENDO, M. Primary structure and distribution of ryanodine-binding protein isoforms of the bullfrog skeletal muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 17206-17214, 1994.

OZEKI, M. The effects of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. **Comp. Biochem Physiol.**, v. 50, p. 183-191, 1975.

PALADE, P. Drug-induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum: use of pyrophosphate to study caffeine-induced Ca^{2+} release. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 6135-6141, 1987.

PALADE, P. Drug-induced- Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum. III. Block of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release by organic polyamines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 13, p. 6149-6154, 1987.

PALADE, P.; DETTBARN, C.; ALDERSON, B.; VOLPE, P. Pharmacologic differentiation between inositol-1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release and Ca^{2+} - or caffeine-induced Ca^{2+} release from intracellular membrane systems. **Molecular Pharmacology**, v. 36, p. 673-680, 1989.

PALADE, P.; DETTBARN, C.; BRUNDER, D.; STEIN, P.; HALS, G. Pharmacology of calcium release from sarcoplasmic reticulum. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 21, n. 2, p. 295-320, 1989.

PALNITKAR, S. S.; MICKELSON, J. R.; LOUIS, C. F.; PARNES, J. Pharmacological distinction between dantrolene and ryanodine binding sites: evidence from normal and malignant hyperthermia-susceptible porcine skeletal muscle. **Biochem. Journal**, v. 325, p. 847-852, 1997.

PAPA, I. ASTIER, C.; KWIAK, O.; RAYNAUD, F.; BONNAL, C.; LEBART, M.C.; ROUSTAN, C.; BENYAMIN, Y. Alpha actinin-CapZ, an anchoring complex for thin filaments in Z-line. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v. 20, n.2, p. 187-197, 1999.

PAPE, P. C.; KONISHI, M.; BAYLOR, S. M.; SOMLYO, A. P. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers injected with the InsP₃ blocker, heparin. **FEBS LETT**, v. 235, n.1-2, p. 57-62, 1988.

PAUL-PLETZER, K.; PALNITKAR, S. S.; JIMENEZ, L. S.; MORIMOTO, H.; PARNES, J. The skeletal muscle ryanodine receptor identified as a molecular target of [³H] azidodantrolene by photoaffinity labeling. **Biochemistry**, v. 20, p. 541-542, 2001.

PAUL-PLETZER, K.; YAMAMOTO, T.; BHAT, M. B.; MA, J.; IKEMOTO, N.; JIMENEZ, L. S.; MORIMOTO, H.; WILLIAMS, P. G.; PARNES, J. Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 34918-34923, 2002.

PEARLSTONE, J.R.; CARPENTER, M.R.; JOHNSON, P.; SMILLIE, L.B. Amino-acid sequence of tropomyosin-binding component of rabbit skeletal muscle troponin. **Proc Natl Acad Sci, U S A**, v.73, n.6, 1902-1906, 1976.

PECKHAM, M.; YOUNG, P.; GAUTEL, M. Constitutive and variable regions of Z-disk titin/connectin in myofibril formation: a dominant-negative screen. **Cell Struct. Funct.**, v.22:1, p. 95-101, 1997.

PERES, A.; RACCA, C.; BERTOLLINI, L.; STURANI, E. Cytosolic calcium responses induced by photolytic release of 1,4,5-Inositol triphosphate in single human fibroblasts. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1092, p. 89-93, 1991.

PESSAH, I. H.; FRANCINI, A. O.; SCALES, D. J.; WATERHOUSE, A. L.; CASIDA, J. E. Calcium-ryanodine receptor complex. Solubilization and partial characterization from skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p.8643-8648, 1986.

PESSAH, I. N.; WATERHOUSE, A. L.; CASIDA, J. E. The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. **Biophys. Res. Commun.**, v. 128, p. 449-456, 1985.

PETERSON, B.Z.; CATERRAL, W.A. Calcium binding in the pore of L-type calcium channels modulates high affinity dihydropyridine binding. **The Journal of Biological Chemistry, USA**, v. 270, n. 31, p. 18201-18202, 1995.

PHILLIPPE, M. Neomycin inhibition of hormone-stimulated smooth muscle contraction in myometrial tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 30, p. 245-250, 1994.

PHILLIPPE, M.; BASA, A. The effects of ruthenium red , an inhibitor of calcium induced calcium release , on phasic miometrial contraction. **Biochem. Biophys. Res. Common.**, v. 221, p. 656-661, 1996.

PHILLIPS JR, G.N.; FILLERS, J.P.; COHEN, C. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. **J. Mol. Biol.**, v. 192, p-111-131, 1986.

PIKE, G. K.; ABRAMSON, J. J.; SALAMA, G. Effects of tetracaine and procaine on skinned muscle fibres depend on free calcium. **J. Muscle Res. Cell Mot.**, v. 10, p. 337-349, 1989.

PORTER, J. A.; MAKUCK, R. F.; RIVKEES, S. A. Reduction in intracellular calcium levels inhibits myoblast differentiation. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 28942-28947, 2002.

POSTERINO, G. S. ; LAMB, G. D. Effect of nifedipine on depolarization-induced force responses in skinned skeletal muscle fibres of rat and toad. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 19, p. 53-65, 1998.

POTTER, J.D. . The content of troponin, tropomyosin, actin, and myosin in rabbit skeletal muscle myofibrils. **Arch Biochem Biophys**, v.162,n.2, p. 436-441, 1974.

POTTER, J.D.; GERGELY, J. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase **J Biol Chem**, v. 250, n.12, p.4628-4633, Jun., 1979.

POTTER, J.D.; SEIDEL, J.C.; LEAVIS, P.; LEHRER, S.S.; GERGELY, J. Effect of Ca^{2+} binding on troponin C. Changes in spin label mobility, extrinsic fluorescence, and sulfhydryl reactivity. **J Biol Chem**, v.251,n.23, p.7551-7556, 1976.

PROTASI, F.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.; ALLEN, P. D. Role of ryanodine receptors in the assembly of calcim release units in skeletal muscle. **J. Cell Biol.**, v. 140, n.4, p. 831-842, 1998.

PROTASI, f.; TAKEMURA, H.; WANG, Y.; WAYNE-CHEN, S. R. MEISSENER, G.; ALLEN, P. D.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. RYR1 and RYR3 Have Different Roles in the Assembly of Calcium Release Units of Skeletal Muscle. **Biophys J.**, v. 79, n. 5, p. 2494-2508, 2000.

QUINN, K.E.; CASTELLANI, L.; ONDRIAS, K.; EHRILICH, B. E. Characterization of the ryanodine receptor/channel of invertebrate muscle. **Am. J. Physiol.** (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 43), v. 274, p. R494-R502, 1998.

RADERMACHER, M.; RAO, V.; GRASSUCCI, R.; FRANK, J.; TIMERMAN, A.P.; FLEISCHER, S.; WAGENKENECHT, T. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. **J. Cell. Biol.**, v. 127, p. 411-423, 1994.

RALL, J. A. Role of parvalbumin in skeletal muscle relaxation. **News Physiol. Sci.**, v. 11, p. 249-254, 1996.

REITER M.; BRANDT, W. Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. **Arzneimittelforschung**, v. 35, n. 1A, p. 408-414, 1985.

RIOS E., MA J., GONZALEZ, A.. The mechanical hypothesis of excitation-contraction coupling. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v. 12, p. 127-135, 1991.

RÍOS, E. ; PIZARRO, G. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Physiol. Rev.**, v. 71, n. 3, p. 849-908, 1991

RIOS, E.; BRUM, G. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Nature**, v. 325, p. 717-720, 1987.

RITOV, V. B.; MENSHIKOVA, E. V.; KOZLOV, Y. P. Heparin induces Ca^{2+} release from the terminal cisterns of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **FEBS LETT.**, v. 188, n. 1, p. 77-80, 1985.

RITTER, M.; MENON, S.; ZHAO, L.; SHIXUAN, X.; SHELBY, J.; BARRY, W. H. Functional importance and caffeine sensitivity of ryanodine receptors in primary lymphocytes. **International Immunopharmacology**, v. p. 339-347, 2001.

ROJAS, C. HIDALGO, C. Inositol triphosphate binds to heavy sarcoplasmic reticulum membranes isolates from frog skeletal muscle. **Biophys. Journal**, v. 57, 432a, 1990.

ROJAS, C.; JAIMOVICH, E. Calcium release modulated by inositol trisphosphate in ruptured fibers from skeletal muscle. **Pflügers Arch**, v. 416, p. 296-304, 1990.

ROUSSEAU, E.; LADINE, J.; LIU, Q.Y.; MEISSNER, G. Activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 267, n.1, p. 75-86, 1988.

RÜEGG, J.C. The Sarcoplasmic Reticulum: Storage and Release of Calcium. In:_____. **Calcium in Muscle Activation**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. 300p.

SAITO, A.; INUI, M.; RADERMACHER, M.; FRANCK, J.; FLEISCHER, S. Ultrastructure of the calcium release channels of sarcoplasmic reticulum. The **Journal of Cell Biology**, v, 107, p. 211-219, 1988.

SALANOVA, M.; PRIORI, G.; BARONE, V.; INTRAVAIA, E.; FLUCHER, B.; CIRUELA, R. A.; McLLHINNEY, R. A. J.; PARYS, J. B.; MIKOSHIBA, K.; SORRENTINO, V. Homer proteins and InsP_3 receptors co-localise in longitudinal sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibres. **Cell Calcium**, v. 32, n. 4, p. 193-200, 2002.

SALEH. C. E.; WARBER, K.D.; POTTER, J.D. The role of tropomyosin-troponin in the regulation of skeletal muscle contraction. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 7, p. 387-404, 1986.

SANCHEZ, X.; CARRASCO, M. A.; VERGARA, J.; HIDALGO, C. Inositol 1,4,5-trisphosphate activity in membranes isolated from amphibian skeletal muscle. **FEBS Lett.**, v. 279, p. 58-60, 1991.

SANDOW. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Pharmacol. Rev.**, v.17, p. 265-320, 1965

SASAKI, T.; NAKA, M.; NAKAMURA, F.; TANAKA, T. Ruthenium red inhibits the binding of calcium to calmodulin required for enzyme activation. **Journal Biol. Chem.**, v. 267, p. 21518-21523, 1992.

SATO, T.; AOYAMA, T.; ONO, H. Mechanisms of slow contracture induced by potassium and caffeine in skeletal muscle of the dog. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 34, n. 2, p. 147-152, 1984.

SAYERS, L. G.; MICHELANGELI, F. The inhibition of the 1,4,5-trisphosphate receptor from rat cerebellum by spermine and others polyamines. **Neuroscience Research**, v. 30, p. 1203-1208, 1993.

SCHNEIDER, M. F. Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 56, p. 463-484, 1994.

SCHNEIDER, M. F. Effects of membrane potential on the capacitance of skeletal muscle fibers. **The Journal of General Physiology**, v. 67, p. 125-183, 1976.

SCHNEIDER, M. F.; CHANDLER, W. K. Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: possible step in Excitation-Contraction Coupling. **Nature**, v. 242, p. 244-246, 1973.

SCOOTE, M. WILLIAMS, A. J. The cardiac ryanodine receptor (calcium release channel). Emerging role in heart failure and arrhythmia pathogenesis. **Cardiovascular Research**, v. 1, p. 1-14, 2002.

SELL, A. B.; CARLINI, E. A. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. **Pharmacology**, v. 14, n.4, p.367-377, 1976.

SENSCH, O.; VIERLING, W.; BRANDT, W.; REITER M. Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of β -caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p. 1089-1096, 2000.

SHARP, A. H.; IMAGAWA, T.; LEUNG, A. T.; CAMPBELL, K. P. Identification and characterization of the dihydropyridine-binding subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. **Journal Biol. Chem.**, v. 262, p. 12309-12315, 1987.

SHIH, C.L.; CHEN, M.J.; LINSE, K.; WANG, K. Molecular contacts between nebulin and actin: cross-linking of nebulin modulates to the N-terminus of actin. **Biochemistry**, v.36, n.7, p.1814-1825, Feb., 1997.

SHIROKOVA , N.; RÍOS, E. Caffeine enhances intramembraneous charge movement in frog skeletal muscle by increasing cytoplasmic Ca^{2+} concentration. **Journal of Physiology**, v. 493.2, p. 341-356, 1996.

SHOSHAN, V.; MACLENNAN, D. H.; WOOD, D. S. A proton gradient controls a calcium-release channel in sarcoplasmic reticulum. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 78, p. 4828-4832, 1981.

SHOSHAN-BARMATZ, V.; ASHLEY, R. H. The Structure, Function, and Cellular Regulation of Ryanodine-sensitive Ca^{2+} Release Channels. **International Review of Cytology**, v. 183, p. 185-270, 1998.

SHOSHAN-BARMATZ, V.; ZCHUT, S. The interaction of local anesthetic with the ryanodine receptor of the sarcoplasmic reticulum. **Journal of Membr. Biol.**, v. 133, p. 171-181, 1993.

SILVEIRA-GOMES, A. R. **Efeitos do eugenol nos mecanismos de liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de anfíbio**. Curitiba, 2000. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SMITH, J. S.; CORONADO, R.; MEISSNER, G. Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated channels. **Nature**, v. 316, p. 446-449, 1985.

SMITH, J.; CORONADO, R.; MEISSNER, G. Single Channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca^{+2} , and ATP and modulation by Mg^{+2} . **J. Gen. Physiol.**, v. 88, p. 573-588, 1986.

SONNLEITNER, A.; COPELLO, J.; FLEISCHER, S.; SORRENTINO, V.; SCHINDLER, H. Gating of ryanodine receptor 1,2 and 3 (RyR1, RyR2,RyR3) by ATP in the absence of calcium ion (Abstract). **Biophys. J.**, v. 72, A375, 1997.

SORENSEN, M. M.; COELHO, H. S. L.; REUBEN, J. P. Caffeine inhibition of calcium accumulation by sarcoplasmic reticulum in mammalian skinned fibers. **J. Membr. Biol.**, v. 90, p. 219-230, 1986.

SORIMACHI, H. FREIBURG, A.; KOLMERER, B.; ISHIMURA, S.; STIER, G.; GREGORIO, C.C.; LABEIT, D.; LINKE, W.A.; SUZUKI, K.; LABEIT, S. Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. **J. Mol. Biol.**, v. 270, n. 5, p. 688-695, 1997.

SORRENTINO, V.; BARONE, V.; ROSSI, D. Intracellular Ca^{2+} release channels in evolution. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 10, n. 6, p. 662-667, 2000.

SQUIRE, J. **The structural basis of muscular contraction**. Plebun Press, New York, 1981.

STANGE, M.; TRIPATHY, A.; MEISSNER, G. Two domains in dihydropyridine receptor activate the skeletal muscle Ca^{2+} release channel. **Biophysical Journal**, v. 81, p. 1419-1429, 2001.

STARR, R.; ALMOND, R.; OFFER, G. Location of C-proteina, H-protein and X-protein in rabbit skeletal fibre types. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v. 6, p. 227-256, 1985.

STEPHENSON, E. W. Activation of fast skeletal muscle: Contributions of studies on skinned fibers. **Am. Journal Physiol.**, v. 240, p. 1-19, 1981.

STEVENS, A.; LOWE, J. S. Células Contráteis. In:_____ **Histologia**. São Paulo: Manole, 1995. p. 57-61.

STICHT, F. D.; SMITH, R. D. Eugenol: some pharmacological observations. **Journal of Dental Research**, v. 50, n. 6, p. 1531, 1971.

STOKES, D. L.; WAGENKENECHT, T. Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum- Structure and function of Ca^{2+} -ATPase and ryanodine receptor. **Eur. Journal Biochem.**, v. 267, p. 5274-5279, 2000.

STROMER, M.H. Immunocytochemical localization of proteins in Striated muscle. **International Review of Cytology**, v. 42, p. 61-144, 1992.

STROMER, M.H. Immunocytochemistry of the muscle cell cytoskeleton. **Microsc. Res. Tech.**, v. 31, nº 2, p. 95-105, jun, 1995.

SUDA, N. Involvement of dihydropyridine receptors in terminating Ca^{2+} release in rat skeletal myotubes. **J. Physiol.**, v.486, p. 105-112., 1995.

SUZUKI, T.; OBARA, K.; NAGAI, T. Effect of ruthenium red on excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle. **Jnp Journal Physiology**, v. 30, n. 1, p. 49-59, 1980.

SZCZESNA, D.; GUZMAN, G.; MILLER, T.; ZHAO, J.; FAROKHI K.; ELLEMBERGER, H.; POTTER, J.D. The role of the four Ca^{2+} binding sites of troponin C in the regulation of skeletal muscle contraction. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n.14, p-8381-8386, 1996.

SZENTESI, P.; COLLET, C.; SÁRKÖZI, S.; SZEGEDI, C.; JONA, I.; JACQUEMOND, V.; KOVÁCS, L.; CSERNOCH, L. Effects of dantrolene on steps of excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle fibers. **J. Gen Physiol.**, v. 118, p. 355-375, 2001.

SZÜCS, G.; CSERNOCH, I.; MAGYAR, J.; KOVÁCS, L. Contraction threshold and the "hump" component of charge movement in frog skeletal muscle. **J. Gen Physiol.**, v.97, p. 897-911, 1991

TAKEMURA, H., BENNETT, L.; TANABE, T.; BEAM, K. G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. Restoration of junctional tetrads in dysgenic myotubes by dihydropyridines receptor cDNA. **Biophys. Journal**, v. 67, p. 793-803, 1994.

TAKESHIMA, H.; IKEMOTO, T.; NISHI, M.; NISHIYAMA, N.; SHIMUTA, M.; SUGITANI, Y.; KUNO, J.; SAITO, I.; SAITO, H.; ENDO, M.; IINO, M.; NODA, T. Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. **J. Biol. Chem**, v. 271, p. 19649-19652, 1996.

TAKESHIMA, H.; NISHIMURA, T.; MATSUMOTO, H.; ISHIDA, H.; KANGAWA, K.; MINAMINO, N. MATSUO, H.; UEDA, M.; HANAOKA, M.; HIROSE, T. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. **Nature**, v. 339, p. 439-445, 1989.

TALON, S.; HUCHET-CADIOU, C.; LÉOTY, C. Rapid cooling-induced contractures in rat skinned skeletal muscle fibres originate from sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release through ryanodine and inositol trisphosphate receptors. **Pflügers Arch.- European Journal of Physiology**, v. 441, p. 108-117, 2000.

TALON, S.; HUCHET-CADIOU, C.; LÉOTY, C. Inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} release in rat fast-and slow-twitch skinned muscle fibres. **Pflügers Archiv.- European Journal of Physiology**, v. 238, p. 804-816, 1999.

TALON, S.; HUCHET-CADOU, C.; LÉOTY, C.; Negative inotropic effect of heparin on tension development in rat skinned skeletal muscle fibres. **European Journal of Pharmacology**, v. 327, p. 33-40, 1997.

TALON, S.; VALLOT, O.; HUCHET-CADIOU C.; LOMPRÉ, A. M.; LÉOTY, C. IP₃-induced tension and IP₃-receptor expression in rat soleus muscle during postnatal development. **American Journal Physiology Integrative Comp Physiol.** v, 282, p.R1164-R1173, 2002.

TALON, S.; VALLOT, O.; HUCHET-CADIOU, C.; LOMPRÉ, A-M.; LÉOTY, C. IP₃-induced tension and IP₃-receptor expression in rat soleus muscle during postnatal development. **Journal of Cell Biology**, v.282, n.4, p. 1164-1173, 2002.

TANABE, T. ;BEAM, K. G. ; BRETT, A. A.; NIIDOME, T. ; NUMA, S. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 346, p. 567-569, 1990.

TANABE, T. BEAM, K. G.; POWELL, J. A.; NUMA, S. Restoration of excitation-contraction coupling and slow current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. **Nature**, v. 336, p. 134-139, 1988.

TANABE, T.; TAKESHIMA, H.; MIKAMI, A.; FLOCKERZI, V.; TAKAHASHI, H.; KANGAWA, K.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; HIROSE, T.; NUMA, S. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. **Nature**, v. 328, p. 313-318, 1987.

THORENS, S.; ENDO, M. Calcium induce calcium release and depolarization-induced calcium release: their physiological significance. **Proc. Japan Acad.**, v. 51, p. 473-478, 1975.

TREVES, S. CHIOZZI, P.; ZORZATO, F. Identification of the domain recognized by anti- (ryanodine receptor) antibodies which affect Ca⁺²- induced Ca⁺² release. **Biochem. J.**, v. 291, p. 757-763, 1993.

TRIMM, J. L.; SALAMA, G.; ABRAMSON, J. J. Sulphydryl oxidation induces rapid calcium release from sarcoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 16092-16098, 1986

VENOSA, R. A.; HOYA, A. Effect of caffeine on K⁺ effex in frog skeletal muscle. **Pflugers Arch.**, v. 437, n. 3, p. 417-422, 1999.

VERGARA, J. TSIEN, R. Y.; DELAY, M. Inositol 1,4,5-trisphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 6352-6356, 1985.

VOLPE, P.; PALADE, P.; COSTELLO, B.; MITCHELL, R. D.; FLEISCHER, S. Spontaneous calcium release from sarcoplasmic reticulum: effect of local anesthetics. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 12434-12442, 1983.

VOLPE, P.; SALVIATI, G.; DI VIRGILIO, F.; POZZAN, T. Inositol 1,4,5-triphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. **Nature**, v. 316, p. 6352-6356, 1985.

WAGENKNECHT, T.; RADERMACHER, M.; GRASSUCCI, R.; BERKOWITZ, J.; XIN, H.-B.; FLEISCHER, S. Locations of calmodulin and FK506-binding protein on the three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor. **The Journal of Biol. Chem.**, v. 272, n.51, p. 32463-32471, Dec., 1997.

WALKER, J.W.; SOMLYO, A.V.; SOMLYO, A.P.; GOLDMAN, Y.E. ; TRENTHAM, D. R. Kinetics of smooth muscle and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. **Nature**, v. 327, p. 249-252, 1987.

WANG, J. P.; NEEDLEMAN, D. H.; SERYSKEV, A. B.; AGDASI, B.; SLAVIK, K. J.; LIU, S. Q.; PEDERSEN, S. E.; HAMILTON, S. L. Interaction between ryanodine and neomycin binding sites on Ca^{2+} release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 14, p. 8387-8393, 1996.

WANG, M. C.; VELARDE, G.; FORD, R. C.; BERROW, N. S.; DOLPHIN, A. C.; KITMITTO, A. 3D structure of the skeletal muscle Dihydropyridine receptor. **Journal Mol. Biol.**, v. 323, p. 85-98, 2002.

WATRAS, J.; BENEVOLENSKY, D. Inositol 1,4,5-triphosphate-induced calcium release from canine aortic sarcoplasmic reticulum vesicles **Biochim Biophys Acta**, v. 923, p. 354-363, 1987.

WEBER, A.; HERZ, R. The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. **J. Gen Physiol.**, v. 52, p. 750-759, 1968.

WEIGL, L. G.; HOHENEGGER, M.; KRESS, H. G. Dihydropyridine-induced Ca^{2+} release from ryanodine sensitive Ca^{2+} pools in human skeletal muscle cells. **Journal of Physiology**, v. 525.2, p. 461-469, 2000.

WHITE, M. D.; DENBOROUGH, M. Dantrolene and calcium uptake by sarcoplasmic reticulum of malignant hyperpyrexia-susceptible pigs. **Gen. Pharmacol.**, v. 15, n. 2, p. 129-132, 1984.

WILD, J. S.; GIRI, S. N.; MOORE, R.; PESSAH, I. N. Characterization of [^3H] ryanodine binding sites in mammalian lung. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 379, n. 1, p. 109-118, 2000.

WOLOSKE, H.; PACHECO, A. G. F.; MEIS, L. Local anesthetic induced fast Ca^{2+} efflux through a nonenergized state of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 9, p. 5785-5789, 1992.

WYSKOVSKY, W. Caffeine-induced calcium oscillations in heavy-sarcoplasmic-reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. **Eur. Journal. Biochemistry**, v. 221, p. 317-325, 1994.

WYSKOVSKY, W.; HOHENEGGER, M.; PLANK, B.; HELLMANN, G.; KLEIN, S.; SUKO, J. Activation and inhibition of the calcium-release channel of isolated skeletal muscle heavy sarcoplasmic reticulum: models of the calcium-release channel. **Eur. J. Biochem.**, v. 194, p. 549-559, 1990.

XU, L.; JONES, R.; MEISSNER, G. Effects of local anesthetics on single channel behavior of skeletal muscle calcium release channel **J. Gen. Physiol.**, v. 101, p. 207-233, 1993.

XU, L.; TRIPATHY, A.; PASEK, D. A.; MEISSNER, G. Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 46, p. 32680-32691, 1999.

YANG, Y.; MAKITA, T.; Immunocytochemical colocalization of desmin and vimentin in human fetal skeletal muscle cells. **Anat. Rec.**, v.246:1, p.64-70, 1996.

YOUNG, P.; FERGUN, C.; BAÑUELOS, S.; GAUTEL, M. Molecular structure of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin. **EMBO J.**, v-7, n.6, p. 1614-1624, 1998.

YOSHIOKA, T. NAGAMI, K.; TAMAKI, T.; NAKANO, S. The effects of detergent on contractility and ultrastructure of frog skeletal muscle. **Jpn. J. Physiol.**, v. 36, p. 379-390, 1986.

ZAHRADNIKOVA, A.; PALADE, P. Procaine effects on single sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channels. **Biophys. J.**, v. 64, p. 991-1003, 1993.

ZHANG, L.; BRADLEY, M. E.; KHOYI, M.; WESTFALL, D. P.; BUXTON, I.L. Inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding sites in smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 109, p. 905-912, 1993.

ZHAO, F.; LI, P.; WAYNE, S. R.; LOUIS, C. F.; FRUEN, B. R. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca^{2+} release channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 13810-13816, 2001.

ZHU, X.; GURROLA, G.; JIANG, M. T.; WALKER, J. W.; VALDIVIA, H. H. Conversion of an inactive cardiac dihydropyridine receptor II-III loop segment into forms that activate skeletal ryanodine receptor. **FESB Lett.**, v.450, n.3, p. 221-226, 1999.

ZORZATO, F.; FUJII, J.; OTSU, K.; PHILIPS, M.; GREEN, N. M., LAI, L. A.; MEISSNER, G.; MACLENNAN, D. H. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca^{+2} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v.265, p. 2244-2256, 1990.

ZOT A. S.; POTTER J. D. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. **Annu Rev Biophys Biophys Chem**, v.16, p.535-559, 1987.

ZUCCHI, R.; RONCA-TESTONI, S. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} Channel/Ryanodine receptor: Modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacological Reviews*, v. 49, n. 1, p. 1-55, 1997.