

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROBSON RUIZ OLIVOTO



ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÕES ENVOLVIDOS NO AUMENTO DE  
TENSÃO BASAL INDUZIDO PELO EUGENOL EM TECIDO ATRIAL DE RATOS



CURITIBA

2014

ROBSON RUIZ OLIVOTO

ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÕES ENVOLVIDOS NO AUMENTO DE  
TENSÃO BASAL INDUZIDO PELO EUGENOL EM TECIDO ATRIAL DE  
RATOS

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular – Área Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Rosalvo Tadeu H. Fogaça

CURITIBA

2014

Olivoto, Robson Ruiz

Efeitos do Eugenol no Músculo Atrial de Ratos / Robson Ruiz  
Olivoto – Curitiba, 2014.

Orientador: Dr. Rosalvo Tadeu H. Fogaça.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Área de Concentração – Fisiologia.

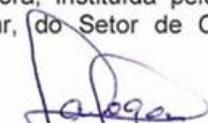
1. Músculo Cardíaco.
2. Eugenol.
3. Tensão de Repouso.
4. Ausência de Cálcio.

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

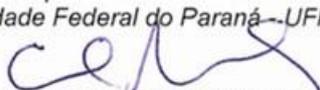
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

### PARECER

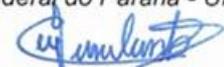
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
**Prof. Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça**

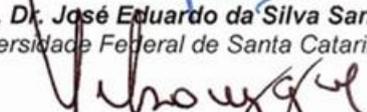
Orientador e presidente da banca  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

  
**Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza**

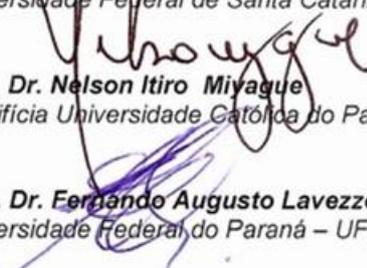
Universidade Federal do Paraná - UFPR

  
**Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos**

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

  
**Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

  
**Prof. Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias**

Universidade Federal do Paraná - UFPR.

E tendo como suplentes,

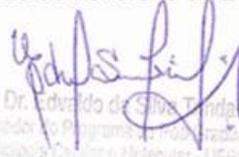
**Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco**

Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o candidato **Robson Ruiz Olivoto**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Efeitos do Eugenol no Músculo Atrial de Rato", são de parecer favorável à APROVAÇÃO do acadêmico, habilitando-o ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2014

  
Prof. Dr. Edvaldo de Silva Tondati  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular - UFPR  
Mar. 1975

Dedico esta pesquisa a uma pessoa muito importante em minha vida, foi companheira nos momentos felizes e mais companheira nos momentos difíceis, foi fundamental para que eu pudesse concluir esta tese, foi e sempre será meu “*porto seguro*”, minha esposa, Bruna Précoma.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça, por toda dedicação, compreensão e confiança dedicadas a mim.

Um agradecimento especial ao meu orientador de mestrado, Carlos Estevam Nolf Daminani, sua dedicação e seus ensinamentos foram de imensurável importância durante minha formação como cientista, sem eles isso nunca seria possível, a você “CHEFE” meus agradecimentos de coração.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilana Kassouf Silva pela imprescindível colaboração durante a realização desta pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica e de pós-graduação com os quais trabalhei.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular que durante suas aulas ou em conversas informais colaboraram significativamente com o desenrolar de meus experimentos.

Aos funcionários do Biotério da Universidade federal do Paraná, setor de Biológicas.

## RESUMO

O eugenol, é um óleo essencial, extraído do cravo da Índia e tem ampla utilização na odontologia e na indústria alimentícia. Dados da literatura demonstram que, em papilares intactos, o Eugenol em altas concentrações (5 mM), induz o aumento da tensão de repouso. O mesmo pode ser observado em preparações de células musculares esqueléticas permeabilizadas, sendo, tais contrações, parcialmente inibidas por 2-APB, um bloqueador de IP<sub>3</sub>R. Neste trabalho avaliamos se a capacidade do Eugenol em aumentar a tensão de repouso de trabéculas de músculo atrial é independente de Ca<sup>2+</sup>. Foram utilizados ratos Wistar (250-300g) e anestesiados por inalação de éter etílico. Após toracotomia, os corações foram removidos e perfundidos com solução de Ringer para a dissecação adequada. Após serem dissecadas, as trabéculas, foram imersos em cubas de 2,5 ml (Ringer 28±1°C), gaseificados (oxigênio), pH 7,4. Na técnica de trabéculas intactas, os átrios foram estimulados por pulsos retangulares (0,5 Hz). Na técnica de fibras permeabilizadas (*skinned fibers*), as trabéculas foram dissecadas em Solução R (tabela 1), em seguida permeabilizadas por saponina e/ou Triton X-100. Em trabéculas intactas, uma curva concentração-resposta ao Eugenol foi realizada em solução de Ringer Normal. Os experimentos com trabéculas atriais intactas foram repetidos utilizando-se bloqueadores de canais liberadores de Ca<sup>2+</sup> do RS na ausência e na presença de Eugenol, em solução Ringer Normal e Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. Na presença de Procaína e Rianodina, bloqueadores da liberação de Ca<sup>2+</sup> do RS, tanto em Ringer normal quanto em Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>, o Eugenol foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso. A inibição total da capacidade do eugenol em aumentar a tensão de repouso foi possível com a utilização do BDM, um inibidor da ciclização das proteínas contráteis. Após o esgotamento do RS pela cafeína, em solução Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>, o eugenol foi capaz de aumentar a tensão de repouso. Os dados sugerem que a via pela qual atua o eugenol é independente de Ca<sup>2+</sup> armazenado no RS, porém é resultado de um estado ativo de ciclização das pontes cruzadas. Em trabéculas permeabilizadas, o vermelho de rutênio não foi capaz de inibir o aumento da tensão de repouso. Da mesma forma que em trabéculas intactas o BDM foi capaz de reverter a tensão de repouso induzida por eugenol. Mesmo na presença de alta concentração de EGTA o eugenol é capaz de induzir aumento da tensão de repouso. Quando as trabéculas foram permeabilizadas por Triton X-100 a tensão de repouso é revertida, o mesmo foi observado que as trabéculas foram permeabilizadas por saponina por 80 minutos. O tratamento com colchicina potencializou os efeitos do eugenol. Os resultados dos experimentos com arsenito, sugerem, que uma das vias pela qual atua o eugenol é através da inibição da p38 MAPk, e os experimentos com dosagem de ATP indicam que outra possível via de atuação do eugenol seja através da redução deste composto em solução. Os resultados, em conjunto, indicam que a atuação do eugenol não é diretamente nas proteínas contráteis, atua por uma via independente de Ca<sup>2+</sup>, parece atuar por uma via celular, que pode estar associada aos microtúbulos. Como parece, o eugenol, não atua por uma única via, segundo nossos resultados, ele pode atuar através da via da p38 MAPk e via redução de ATP livre.

Palavras chave: eugenol, trabéculas atriais, força na ausência de cálcio.

## ABSTRACT

The eugenol, is an essential oil extracted from cloves , and is widely used in dentistry and in the food industry . Literature data show that in intact papillary, the eugenol at high concentrations (5 mM), induces the increase in resting tension . The same can be observed in preparations of permeabilized skeletal muscle cells, and such contractions, partially inhibited by 2-APB, a blocker of IP<sub>3</sub>R. In this work we evaluated the ability of eugenol to increase the resting tension of atrial trabeculae muscle is independent of Ca<sup>2+</sup>. Wistar rats (250 -300g) rats were used and anesthetized by inhalation of diethyl ether. After thoracotomy, the hearts were removed and perfused with Ringer's solution for proper dissection. After being dissected, the trabeculae were immersed in 2.5 ml tubs (Ringer 28±1°C) aerated (oxygen ) pH 7.4. In the technique of intact trabeculae, the atria were stimulated by rectangular pulses (0.5Hz). In the technique of permeabilized fiber (skinned fibers) trabeculae were dissected Solution R (Table 1) then permeabilized by saponin and/or Triton X-100. In intact trabeculae a concentration-response curve to eugenol was carried out in normal Ringer solution. The experiments with intact atrial trabeculae were repeated using channel blockers releasing Ca<sup>2+</sup> from the SR in the absence and presence of eugenol in normal ringer's and free-Ca<sup>2+</sup> ringer solution. In the presence of Procaine and Ryanodine, blocking the release of Ca<sup>2+</sup> from the SR, both in normal ringer's and free-Ca<sup>2+</sup> ringer solution, eugenol was able to induce an increase in resting tension. A total inhibition of the ability of eugenol increase in resting tension was possible with the use of BDM, an inhibitor of cyclization of contractile proteins. After the exhaustion of the stock of Ca<sup>2+</sup> from SR by caffeine in free-Ca<sup>2+</sup> ringer solution, eugenol was able to increase the resting tension. The data suggest that the will acts by which eugenol is independent of Ca<sup>2+</sup> stored in the SR, but is the result of an active state cyclization of cross-bridges. In permeabilized trabeculae, the ruthenium red was not able to inhibit the increase in resting tension. Just as in intact trabeculae BDM was able to reverse the resting tension induced eugenol. Even in the presence of high concentration of EGTA eugenol is able to induce an increase in resting tension. When the trabeculae were permeabilized by Triton X-100 resting tension is reversed, it was observed that the trabeculae were permeabilized by saponin for 80 minutes. Treatment with colchicine potentiate the effect of eugenol. The results of experiments with arsenite suggest that one of the ways in which eugenol is acting via inhibition of p38 MAPK and the ATP measurement experiments indicate that another possible way of action of eugenol is by reducing this compound in solution. The results together indicate that the activity of eugenol is not directly on the contractile proteins, acts by a Ca<sup>2+</sup> independent pathway, appears to act by a cellular pathway that may be associated with microtubules. As it seems, eugenol, does not act through a single wire, second our results, it can act through the p38 MAPK pathway and via reduction of free ATP.

Keywords: eugenol , atrial trabeculae , force in the absence of calcium.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura esquemática do túbulo-T e o retículo sarcoplasmático....	22
Figura 2 - Miofilamentos: Miosina.....	23
Figura 3 - Miofilamento: Actina.....	25
Figura 4 – A Condição de Repouso .....	27
Figura 5 – Os Miofilamentos em Presença de $Ca^{2+}$ .....	27
Figura 6 – (A) O Canal de Cálcio. (B) Estrutura dos Canais Lentos de $Ca^{2+}$ (CACNA1C).....	29
Figura 7 – <i>Cálcio que induz a liberação de cálcio</i> (CICR).....	38
Figura 8 - Maquinaria de sinalização do $Ca^{2+}$ nos miócitos atriais.....	41
Figura 9 – AEC Via Estimulação $\alpha$ -Adrenérgica.....	43
Figura 10 - Estrutura química da molécula de eugenol.....	44
Figura 11 – Fotos dos procedimentos experimentais para dissecação. A – foto do estéreo microscópio da marca Zeiss utilizado para dissecação dos átrios e das trabéculas; B – foto de um átrio após dissecado; C – visão interna de um átrio, permite observar a disposição das trabéculas possibilitando assim identificar as trabéculas a serem dissecadas; D – foto de uma única trabécula que foi dissecada para utilização nos experimentos. Fonte: Olivoto.....	50
Figura 12 – Fotos dos equipamentos utilizados para realização dos experimentos; A.1 – Sistema de estimulação elétrica indireta; A.2 – sistema de gaseificação; B – foto da plataforma de acrílico contendo as câmaras (*) onde foram adicionadas as soluções experimentais; C.1 – transdutor de força; C.2 – braço mecânico móvel que permitia o estiramento inicial da preparação; D – foto do sistema completo para realização dos experimentos, contendo estéreo microscópio, transdutor de força e plataforma de acrílico; E – trabécula montada entre o transdutor de força e o braço mecânico móvel. Fonte: Olivoto.....	52
Figura 13 - (A): Registro típico dos efeitos do eugenol, dose-resposta, sobre a tensão de repouso desenvolvida pelas trabéculas de músculo atrial de ratos. (B): Efeitos do eugenol, em diferentes concentrações, sobre a tensão de repouso desenvolvida pelas trabéculas de músculo atrial.	71

- Figura 14 – Efeitos do eugenol após tratamento com procaína sobre a tensão de repouso desenvolvida pelas trabéculas de músculos atriais de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer Normal. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso..... 72
- Figura 15 – Efeitos do eugenol após tratamento com procaína sobre tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso..... 73
- Figura 16 – Efeitos do eugenol após tratamento com rianodina sobre a tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer Normal. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso..... 74
- Figura 17 – Efeitos do eugenol após tratamento com rianodina sobre a tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso ..... 75
- Figura 18 – Efeitos do eugenol após tratamento com rianodina e procaína sobre a tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer Normal. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. . 76
- Figura 19 – Efeitos do eugenol após tratamento com rianodina e procaína sobre a tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso .. 77
- Figura 20 – Efeitos do eugenol após tratamento com procaína e BDM sobre tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer Normal. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso .. 78
- Figura 21 – Efeitos do eugenol após tratamento com procaína e BDM sobre tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso.. 79
- Figura 22 – Efeitos do eugenol após o esgotamento do cálcio armazenado no RS por ação da cafeína (30 mM) sobre a tensão de repouso

desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ . A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso .....	81
Figura 23 – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso.....	82
Figura 24 – Efeitos do eugenol (5 mM) sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas tratadas com vermelho de rutênio (10 $\mu\text{M}$ ).....	83
Figura 25 – Efeitos do eugenol (5 mM) sobre preparações de trabéculas atriais na presença de BDM (10 mM) e (30 mM). .....	84
Figura 26: Relação entre força em concentrações diferentes de $\text{Ca}^{2+}$ , na ausência e presença de Eugenol em trabéculas permeabilizadas com Triton X-100.....	84
Figura 27 – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos e Triton X-100 (1% - vol/vol). A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso.....	86
Figura 28 – Efeitos do Eugenol (5 mM) em trabéculas submetidas há tempos diferentes de exposição à saponina (30 $\mu\text{g/ml}$ ).. .....	87
Figura 29 – Efeito do Eugenol (5 mM) em trabéculas permeabilizadas com saponina (30 $\mu\text{g/ml}$ ) e incubadas com DTT (100 $\mu\text{M}$ ) (Ditiotreitol) por 20 minutos. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso.....	88
Figura 30 – Efeito do Eugenol em trabéculas permeabilizadas com saponina (30 $\mu\text{g/ml}$ ) e tratadas com Colchicina (30 $\mu\text{M}$ ) por 20 minutos. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. ....	89
Figura 31 – Efeitos do Eugenol (5 mM) sobre a tensão de repouso desenvolvida pelas trabéculas atriais permeabilizadas com Triton X-100 (1% vol/vol) em solução contendo o produto da permeabilização por saponina (80 minutos) e solução contendo o produto da permeabilização por saponina (80 minutos) e colchicina (30 $\mu\text{M}$ ). .....	90
Figura 32 – Efeitos do arsenito na presença de eugenol (5 mM), curva dose resposta. Os experimentos foram realizados em trabéculas intactas e solução Ringer Normal (IC <sub>50</sub> =6,78 mM).. .....	91

Figura 33 – Efeitos do Eugenol na presença e ausência de Arsenito. ....	92
Figura 34 – Efeitos do Eugenol na presença e ausência de Arsenito. Os experimentos foram realizados com trabéculas permeabilizadas por saponina (30µg/ml) por 20 minutos; incubada em arsenito (7 mM) por 30 minutos.....	93
Figura 35 – Efeitos do Eugenol na presença e ausência de Arsenito. As trabéculas foram permeabilizadas com Triton X-100 (1% - vol/vol) por 10 minutos.....	94
Figura 36 – O efeito do eugenol sobre a concentração de ATP em músculo atrial. A concentração de ATP foi medida na ausência (C) e na presença (T) de eugenol, a 0, 30 e 60 minutos..	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das soluções usadas nos experimentos com fibras permeabilizadas por Saponina e por Triton X-100. ....	57
Tabela 2 – Efeitos do eugenol em diferentes concentrações, curva dose resposta.....	70
Tabela 3 – Trabéculas tratadas com procaína. Experimentos em ringer normal.....	71
Tabela 4 – Trabéculas tratadas com procaína. Experimentos em ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ .....	73
Tabela 5 – Trabéculas tratadas com rianodina. Experimentos em ringer normal.....	74
Tabela 6 – Trabéculas tratadas com rianodina. Experimentos em ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ .....	75
Tabela 7 – Trabéculas tratadas com procaína. Experimentos em ringer normal.....	76
Tabela 8 – Trabéculas tratadas com procaína e rianodina .Experimentos em ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ .....	77
Tabela 9 – Trabéculas tratadas com procaína e BDM. Experimentos em ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ .....	78
Tabela 10 – Trabéculas tratadas com procaína e BDM. Experimentos em ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ .....	79
Tabela 11 – Experimentos para esgotamento do $\text{Ca}^{2+}$ do RS por ação da cafeína. ....	80
Tabela 12 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e Triton X-100.....	82
Tabela 13 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e tratadas com vermelho de rutênio. ....	83
Tabela 14 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e tratadas com vermelho de rutênio. ....	83
Tabela 15 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e Triton X-100, submetidas a cafeína em solução R, eugenol antes e depois de Triton X-100 e solução A antes e depois de Triton X-100.	85

Tabela 16 – Trabéculas permeabilizadas em tempos diferentes (zero, 20, 40, 60 e 80 minutos) por saponina. Relação entre tempo de permeabilização e força e/ou tensão de repouso desenvolvida. ....	87
Tabela 17 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e tratadas com DTT. ....	87
Tabela 18 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e tratadas com Colchicina. ....	89
Tabela 19 – Experimentos de reincorporação do produto da permeabilização por 80 minutos em trabéculas permeabilizadas por Triton X-100. ....	90
Tabela 20 – Curva dose resposta ao arsenito na presença de eugenol (5 mM) em trabéculas intactas. ....	91
Tabela 21 – Resultados dos experimentos para determinar se a toxicidade do arsenito de sódio poderia estar determinando a resposta ao eugenol. ....	92
Tabela 22 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina. Encubação com arsenito de sódio (7 mM). ....	93
Tabela 23 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por Triton X-100, utilizando a solução com o produto da permeabilização de trabéculas por 80 minutos em saponina. Os experimentos foram realizados na presença e ausência de arsenito de sódio (7 mM). ....	94
Tabela 24 – Dosagem de ATP, valores expressos em $\mu\text{M}$ de ATP por grama de proteína. A concentração de ATP foi medida na ausência (C) e presença (T) de eugenol (5 mM) nos tempos 0, 30 e 60 minutos. ....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

+df/dt	- Primeira derivada da produção de força no tempo
AEC	- Acoplamento excitação-contração
AMPC	- Monofosfato cíclico de adenosina
ANP	- fator natriurético atrial (do inglês - atrial natriuretic peptide)
ATP	- Adenosina trifosfato
ATPase	- enzima
CICR	- cálcio que induz a liberação de cálcio (do inglês – calcium induced calcium release)
DAG	- diacil glicerol
-df/dt	- Primeira derivada de decréscimo de força no tempo
DHPR	- Receptor diidropiridínicos
ERK1/2	- quinase regulada por sinal extracelular
FKBP	- Proteína de ligação de 12 kDa associada aos canais de liberação de cálcio.
GDP	- guanosina difosfato
GTP	- guanosina trifosfato
iNOS	- óxido nítrico sintase
IP <sub>3</sub>	- Inositol 1,4-5 trifosfato
IP <sub>3</sub> R	- receptor de IP <sub>3</sub> na membrana do RS (canal liberador de Ca <sup>2+</sup> )
MHC	- Cadeia pesada de miosina
MLC	- Cadeia leve de miosina
NCX	- Trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
NO	- óxido nítrico
PCR	- reação em cadeia da polimerase (do inglês – plumerase chain reaction)
PiP <sub>2</sub>	- fosfatidil inositol difosfato
PKA	- Proteína quinase A
PKC	- Proteína quinase C
PLB	- Fosfolamban
PLC	- fosfolipase C
RS	- Retículo sarcoplasmático
RyR	- Receptor de rianodina
SERCA	- Bomba de cálcio ATPase de membrana de RS
TnC	- Troponina C
TnI	- Troponina I
TnT	- Troponina T

## SUMARIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1 – Estruturas Celulares Envolvidas no Processo de Acoplamento Excitação-Contração (AEC) do Músculo Cardíaco.....	19
Membrana Plasmática (Sarcolema) e Glicocálice .....	20
1.2- Túbulos-T .....	20
1.3- Retículo Sarcoplasmático (RS) .....	21
1.4- Sarcômero e Miofilamentos.....	22
2 – Regulação da Atividade das Proteínas Contráteis .....	25
3 – Biologia Molecular dos Canais de Cálcio dos Miócitos Cardíacos .....	27
3.1- Proteínas que Regulam o Influxo Celular de Cálcio .....	28
I) Canais de cálcio da membrana plasmática.....	28
a) Receptores Diidropiridínicos (DHPRs) .....	29
II- Canais de cálcio da membrana do retículo sarcoplasmático .....	30
a) Receptores de Rianodina (RyRs).....	30
b) Receptores IP <sub>3</sub> (IP <sub>3</sub> Rs).....	32
3.2 – Proteínas que Removem o Cálcio do Citosol .....	35
4 – Processo de Acoplamento Excitação-Contração (AEC).....	36
4.1- Acoplamento excitação-contração e a via de receptores Inositol 1,4,5-trifosfato (IP <sub>3</sub> Rs).....	41
5 – Óleos Essenciais – Eugenol.....	43
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>48</b>
OBJETIVO GERAL .....	48
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
1- Procedimentos Experimentais.....	49
2 – Procedimentos para Experimentos com Trabéculas Intactas.....	51
2.1 – Efeitos do eugenol sobre a tensão de repouso das trabéculas de músculo atrial: Curva Dose-Resposta.....	51
2.2 – Efeitos do eugenol sobre a mobilização do cálcio intracelular e extracelular, em ringer normal e ringer zero cálcio.....	53
2.3 – Efeitos do eugenol sobre as proteínas contráteis.....	54
2.4 – Efeito do Eugenol após o esgotamento dos estoques de Cálcio intracelular por ação da Cafeína .....	55
3 – Procedimentos para Experimentos com Trabéculas Permeabilizadas por Saponina e/ou Triton X-100.....	56
3.1 – Efeitos do eugenol sobre produção de força em trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e Triton X-100 .....	58
3.2 – Efeitos do Vermelho de rutênio (RR) sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina .....	59
3.3 – Efeitos do BDM sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina .....	60

3.4 – Relação entre diferentes concentrações de íons Cálcio na solução banho e a Tensão de Repouso induzida pelo Eugenol .....	61
3.5 – Efeitos do eugenol sobre o processo de AEC antes e depois das fibras atriais serem permeabilizadas com Triton X-100.....	61
3.6 – Efeitos do tempo de exposição a saponina sobre a capacidade de produção de força induzida por Cálcio e Cafeína e elevação da Tensão de Repouso induzida pelo Eugenol.....	62
3.7 – Efeitos do 1,4-Ditiotreitol (DTT) sobre a ação do Eugenol .....	62
3.8 – Efeitos da Colchicina (colch) sobre a ação do Eugenol .....	63
3.9 – Experimentos com o produto da permeabilização das trabéculas e seu efeito sobre o Eugenol.....	64
4 – Possíveis vias de ação do Eugenol.....	65
4.1 – Possível envolvimento da via p38 MAPk.....	65
a) Curva dose resposta ao arsenito de sódio.....	65
b) Recuperação após exposição ao arsenito de sódio .....	65
c) Efeitos do arsenito em trabéculas permeabilizadas por saponina .....	66
d) Efeitos do arsenito em trabéculas permeabilizadas por Triton X-100....	66
4.2 – Redução da concentração de ATP intracelular por ação do eugenol.....	67
5 – Drogas.....	68
6 – Análise Estatística .....	68
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
1 – Experimentos com Estimulação Elétrica Indireta: trabéculas de músculo atrial intacto .....	70
1.1 – Efeitos do Eugenol no processo AEC: curva dose-resposta .....	70
1.2 – Efeitos da Procaína sobre a ação do Eugenol em solução ringer normal	71
1.3 – Efeitos da Procaína sobre a ação do eugenol em solução ringer zero-Ca <sup>2+</sup> .....	72
1.4 – Efeitos da Rianodina sobre a ação do Eugenol em solução Ringer Normal .....	73
1.5 – Efeitos da Rianodina sobre a ação do Eugenol em solução Ringer zero-Ca <sup>2+</sup> .....	75
1.6 – Efeitos da Rianodina e Procaína na ação do Eugenol em solução Ringer Normal .....	76
1.7 – Efeitos da Rianodina e Procaína na ação do Eugenol em solução Ringer zero-Ca <sup>2+</sup> .....	77
1.8 – Efeitos do BDM na ação do Eugenol em solução Ringer Normal .....	78
1.9 – Efeitos do BDM na ação do Eugenol em solução Ringer zero-Ca <sup>2+</sup> .....	79
1.10 – Efeitos do Eugenol após o esgotamento do cálcio armazenado no reticulo sarcoplasmático por ação da cafeína em Ringer zero-Ca <sup>2+</sup> e Ringer zero-Ca <sup>2+</sup> /Zero-Na <sup>+</sup> .....	80
2 – Experimentos com Trabéculas de Músculo Atrial de rato permeabilizadas por saponina e/ou Triton X-100.....	81
2.1 – Efeitos do eugenol sobre a tensão de repouso em trabéculas atriais permeabilizadas por Saponina e Triton X-100.....	81

2.2 – Efeitos do Vermelho de rutênio (RR) sobre a ação do eugenol em trabéculas permeabilizadas por saponina.....	82
2.3 – Efeito do BDM sobre a ação do eugenol em trabéculas permeabilizadas por Saponina .....	83
2.4 – Relação entre força e concentração de cálcio na presença e ausência de eugenol.....	84
2.5 – Efeitos do eugenol sobre tensão de repouso de trabéculas atriais antes e depois de serem permeabilizadas com Triton X-100.....	85
2.6 – Efeitos do tempo de exposição a saponina sobre a capacidade de produção de força induzida por Cálcio e Cafeína e elevação da Tensão de Repouso induzida pelo Eugenol.....	86
2.7 – Efeitos do 1,4-Ditiotreitol (DTT) sobre a ação do Eugenol .....	87
2.8 – Efeitos da Colchicina (colch) sobre a ação do Eugenol .....	88
2.9 – Experimentos com o produto da permeabilização das trabéculas e seu efeito sobre o Eugenol.....	89
3 – Experimentos para identificação das possíveis vias de ação do Eugenol..	90
3.1 – Possível envolvimento da via p38 MAPk.....	90
3.1.1 – Curva dose resposta ao arsenito de sódio .....	90
3.1.2 – Experimentos com Arsenito: recuperação após ação do Arsenito .....	91
3.1.3 – Experimentos com Arsenito: fibras permeabilizadas com saponina.....	92
3.1.4 – Efeitos do arsenito em trabéculas permeabilizadas por Triton X-100 ..	93
3.2 – Redução da concentração de ATP intracelular por ação do eugenol.....	94
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>112</b>

## INTRODUÇÃO

A propriedade de produzir movimento é uma das mais surpreendentes da matéria viva e não se constitui em uma propriedade exclusiva do músculo. Existe uma grande variedade de células capazes de produzi-lo. Por exemplo, os movimentos dos leucócitos; os movimentos dos cílios na superfície de algumas células, etc. Em todos estes casos, contudo, esta produção de movimento é secundária e está subordinada a outra função celular. Entretanto, no músculo constitui a função principal, juntamente com a de gerar força. Assim, a função do tecido muscular é a de produzir movimento e/ou gerar força (Cingolani et al., 2004).

Em conformidade com sua estrutura, propriedades contráteis e função, distinguem-se três tipos de músculo: o músculo esquelético, o músculo liso e o músculo cardíaco.

### **1 – Estruturas Celulares Envolvidas no Processo de Acoplamento Excitação-Contração (AEC) do Músculo Cardíaco**

A maior parte do coração é formada por células musculares contráteis, também conhecidas como *miócitos* ou, mais especificamente, *cardiomiócitos*. O restante se constitui de células marca-passo e tecido de condução (os quais estão relacionados com a geração e propagação da atividade elétrica do coração), vasos sanguíneos e matriz extracelular (Brilla et al., 1991). Apesar de existirem diferentes tipos de células no coração, são os miócitos atriais e ventriculares que através de sua contração completam o enchimento cardíaco com sangue e o propõem através dos vasos sanguíneos promovendo a circulação. Os miócitos ventriculares humanos são maiores, apresentando aproximadamente de 10 a 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro e cerca de 50 a 100  $\mu\text{m}$  de comprimento. Já os miócitos atriais são menores e apresentam aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e cerca de 20  $\mu\text{m}$  de comprimento (Gordon et al., 1966).

Os miócitos cardíacos variam de forma, desde uma simples elipse até um cilindro com ramificações várias vezes mais compridas do que largas. Os miócitos adjacentes estão conectados por estruturas denominadas discos

intercalares. Um segmento destes discos - a junção comunicante ou aberta (*gap junction*) - constitui uma união de baixa resistência elétrica, o que permite uma rápida transmissão dos impulsos de célula a célula e implica uma contração praticamente simultânea de todas as fibras. Isso faz com que o tecido cardíaco, sem constituir um sincício anatômico, comporte-se como tal, do ponto de vista funcional, sendo assim denominado de *sincício funcional* (Gordon et al., 1966).

### **Membrana Plasmática (Sarcolema) e Glicocálice**

No início da década de 1970, micrografias de microscópio eletrônico obtidas por crio-fratura revelaram o verdadeiro arranjo tridimensional dos lipídios e proteínas dentro das membranas celulares. Em consequência dessa observação, foi proposto o modelo do mosaico fluido da membrana (Singer & Nicolson, 1972). A membrana superficial do miócito cardíaco caracterizada então como uma bicamada lipídica, é de natureza lipoprotéica.

Para os fisiologistas, a classificação das proteínas de membrana pela sua função é muito mais útil do que pela sua estrutura. As proteínas da membrana celular funcionam como: (1) *proteínas estruturais*, (2) *enzimas*, (3) *receptores* e (4) *transportadores*, que movem moléculas para dentro e para fora da célula.

A célula cardíaca apresenta ainda uma camada mais externa denominada Glicocálice. Tal camada é constituída principalmente de carboidratos complexos denominados polissacarídeos, com frequência associados com proteínas (glicoproteínas). Estas últimas apresentam carga elétrica negativa com propriedade de ligar-se a íons carregados positivamente tais como os íons cálcio, sódio e magnésio (Bennett, 1963). Assim sendo, a bicamada lipídica está imediatamente próxima ao glicocálice e é usualmente relacionada como o único verdadeiro componente da membrana (sarcolema) constituindo-se, portanto, em um contorno de bicamada de moléculas fosfolipídicas (Curry, 1986).

### **1.2- Túbulos-T**

Nos sarcolemas dos miócitos cardíacos encontramos invaginações, que penetram as células percorrendo-as transversalmente e emitindo ramificações. Estas invaginações são denominadas *Túbulos Transversos* ou *Túbulos-“T”*. Por outro lado, outras pequenas depressões na membrana não conseguem se caracterizar como tal e, vão constituir as denominadas de *Cavéolas*. Pelo fato dos túbulos-T serem uma extensão e de apresentarem a mesma ultraestrutura do sarcolema, eles aumentam a área de superfície da célula em cerca de 30%, facilitando assim que o estímulo excitatório se propague para dentro da célula (Scales, 1981). A organização ultra estrutural do sarcolema cardíaco é importante porque este é o local através do qual o cálcio entra e sai da célula. Assim, a localização de relevantes sistemas de transporte é de importância fundamental. Este é particularmente o caso de existir uma distribuição diferenciada de canais iônicos, bombas e outras especializações da membrana (Almers & Stirling, 1984).

### **1.3- Retículo Sarcoplasmático (RS)**

Anatomicamente, o *Retículo Sarcoplasmático (RS)* se constitui em uma rede espalhada através dos miócitos cardíacos e demarcada por sua bicamada lipídica similar àquela do sarcolema (Page et al., 1971). A principal função dessa organela parece ser o sequestro e a liberação de cálcio para o citoplasma (Winegrad, 1965). As extremidades do RS se encontram próximas e em aposição aos túbulos-T. Nesse local, os túbulos do RS se expandem em projeções em forma de bolsas, as quais se estendem ao longo da superfície interna do sarcolema ou estão dobrados em torno dos túbulos-T. Essas áreas expandidas do RS recebem denominações tais como: *cisterna subsarcolemal* ou *componentes juncionais*. A conexão entre o RS e o Túbulo Transverso é denominada de *Tríade*, enquanto que a conexão entre o RS e a cavéola é denominada de *Díade* (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Exceto pelas junções entre o RS e o sarcolema, a membrana do retículo sarcoplasmático parece homogênea e contém principalmente a Bomba de Cálcio-ATPase (SERCA) (Stewart & MacLenann, 1974; Katz et al., 1986). Assim, a maior parte da superfície do retículo sarcoplasmático parece funcionar basicamente para a remoção do cálcio do citoplasma (Franzini-Armstrong, 1975).

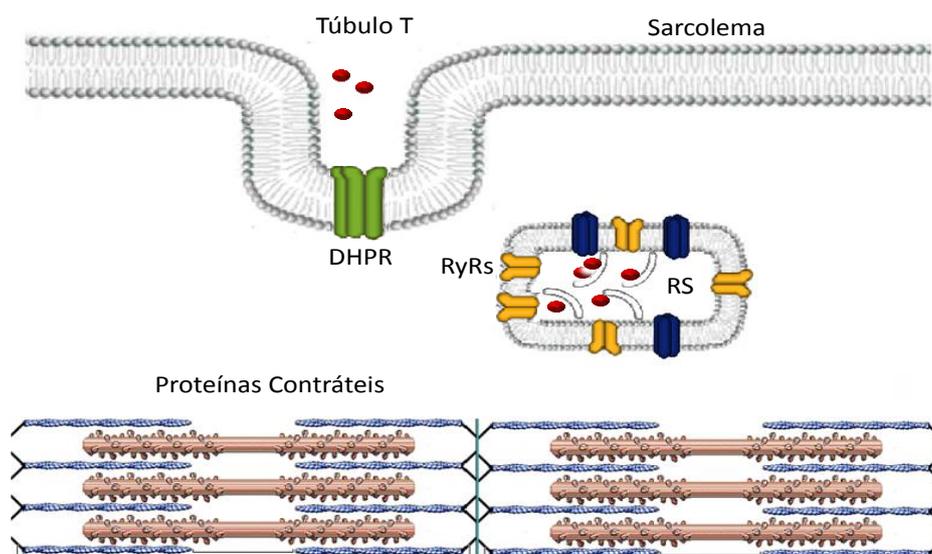


Figura 1 – Estrutura esquemática do túbulo-T e o retículo sarcoplasmático. O retículo sarcoplasmático engloba cada miofibrila. O sistema de túbulos-T está intimamente associado com o retículo sarcoplasmático. (Fonte: Olivoto).

#### 1.4- Sarcômero e Miofilamentos

A principal função do miócito cardíaco é o processo de contração e relaxamento muscular. O *sarcômero* é considerado como uma unidade contrátil básica do miócito e é limitado por duas *linhas* ou *discos Z*.

Para o desempenho dessas funções, contribuem estruturas altamente especializadas denominadas *Miofilamentos* ou *Filamentos Contráteis*. Por sua vez, tais miofilamentos são constituídos pelos filamentos grossos contendo *miosina* e pelos filamentos finos contendo *actina* bem como pelos componentes contráteis do citoesqueleto (Page *et al.*, 1971; Page, 1978).

Cada filamento grosso é constituído por ~300 moléculas de miosina, mas também contêm outras proteínas tais como a *titina* e a *proteína-C*. Cada cadeia pesada de miosina (MW ~450.000) tem uma longa (~130nm) cauda  $\alpha$ -helicoidal e uma cabeça globular (Warshaw, 1996). As caudas da cadeia pesada de miosina formam o eixo principal do filamento grosso. Essas cabeças de miosina formam as *pontes cruzadas* que interagem com a actina para a geração da contração (Offer, 1972; Freiburg & Gautel, 1996). Essas cabeças contêm sítios para a hidrólise do ATP, e têm duas cadeias leves associadas com cada cabeça. Com base na susceptibilidade a proteases específicas, a cadeia pesada de miosina tem sido identificada como *meromiosina leve* (LMM, 2/3 dos 150 nm da

cauda) e *meromiosina pesada (HMM)*. A região central do filamento grosso é desprovida de pontes cruzadas refletindo a relação cauda-a-cauda das moléculas de miosina (Warshaw, 1996). As duas cadeias leves de miosina (*MLC1* e *MLC2*) se ligam a cada cadeia pesada na base do domínio S1 ou na região do pescoço. *MLC1* é também referida como *cadeia leve alcali* ou *essencial (ELC)*. *MLC2* é também chamada de *cadeia leve fosforilável* ou *regulatória (RLC)*. Ambas as cadeias leves conferem estabilidade física ao filamento grosso. Entretanto, a cadeia leve regulatória (*MLC2*) pode também alterar a função em resposta a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  ou fosforilação (Warshaw, 1996). As proteínas do filamento fino e suas interações foram revisadas por Zot & Potter (1987); e por Solaro & Rarick (1998).

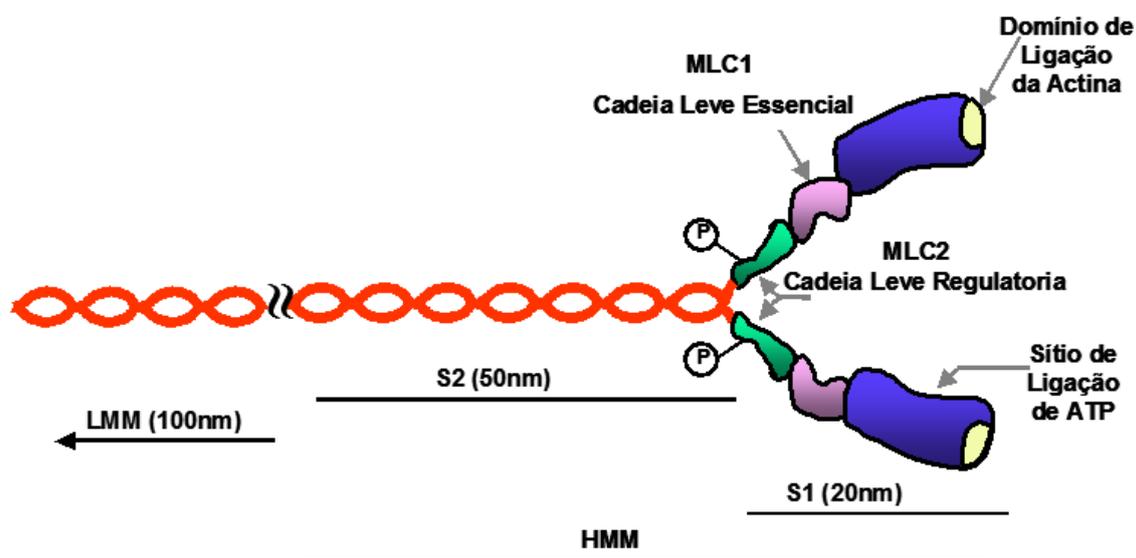


Figura 2 - Miofilamentos: Miosina. A molécula de miosina tem aproximadamente 170 nm de comprimento e apresenta duas cabeças globulares (S1) e caudas (incluindo a meromiosina leve LMM + S2), as quais se apresentam como uma cauda entrelaçada. As duas cadeias leves (MLC) estão indicadas na região do pescoço. (Fonte: Warshaw, 1996).

O filamento fino é constituído por duas cadeias da proteína globular *G-actina* a qual forma a dupla hélice do polímero *F-actina* (Solaro & Rarick, 1998; Rayment *et al.*, 1993 a, b; Bers, 2001). A *Tropomiosina (Tm)* é uma proteína longa e flexível, que se aloja na fenda formada pelos filamentos de actina e envolve cerca de sete monômeros de actina. A tropomiosina é também um duplo filamento formando uma  $\alpha$ -hélice sendo que seus dois filamentos podem estar conectados por pontes dissulfídicas (Lehrer *et al.*, 1997). A cada sétima actina

existe um complexo *Troponina* (*Tn*) agregado a tropomiosina. Tal complexo troponina é formado por 3 subunidades: **a)** *Troponina T* (*TnT*, ou subunidade de ligação da tropomiosina), **b)** *Troponina C* (*TnC*, ou subunidade de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$ ) e **c)** *Troponina I* (*TnI*, ou subunidade inibitória, que também se liga a actina). A *TnT* tem uma região carboxila globular e uma forma alongada que se estende ao longo da *Tm* sobre cerca de 3 monômeros da actina (Ohtsuki, 1979; Flicker *et al.*, 1982). A *TnI* (próxima de seu amino terminal) interage especificamente com as terminações carboxila tanto da *TnT* como da *TnC*. A forte ligação do amino terminal da *TnI* e *TnC* depende da ligação de cálcio ou magnésio aos sítios no carboxila terminal da *TnC*. Na condição de repouso (baixa  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) o carboxila terminal da *TnI* também se liga especificamente à actina, e isto evita que a cabeça de miosina interaja com a actina. Quando o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga ao amino terminal da *TnC*, no sítio regulatório de menor afinidade fisiológica, esta parte da *TnC* se liga ao carboxi terminal da *TnI* induzindo a dissociação da *TnI* da actina. Com isso, a *TnT* induz um movimento da tropomiosina o qual, por sua vez, permitirá a interação da miosina com a actina (Solaro & Rarick, 1998; Rayment *et al.*, 1993 a, b).

Na microscopia eletrônica, o local onde os filamentos de actina e miosina se sobrepõem é denominado *banda A* (*anisotrópica*), a qual se mostra escura na microscopia; em contraste com as zonas mais claras ou *bandas I* (*isotrópicas*) em ambos os lados, a qual contém apenas filamentos finos. No centro da banda A tem uma zona conhecida como *zona H*. Aqui apenas a miosina está presente, porque a sobreposição entre os filamentos finos e grossos termina próximo a esta zona. Cada zona H contém uma região central escura, a *linha-M*. Os filamentos grossos estão interconectados transversalmente na linha-M pela *proteína -M* e pela *miomesina* (Rayment *et al.*, 1993a; Obermann *et al.*, 1995). Uma outra proteína denominada *titina* apresenta uma estrutura extremamente longa e se projeta através do filamento grosso, desde a linha-M até a linha-Z (Gautel & Goulding, 1996).

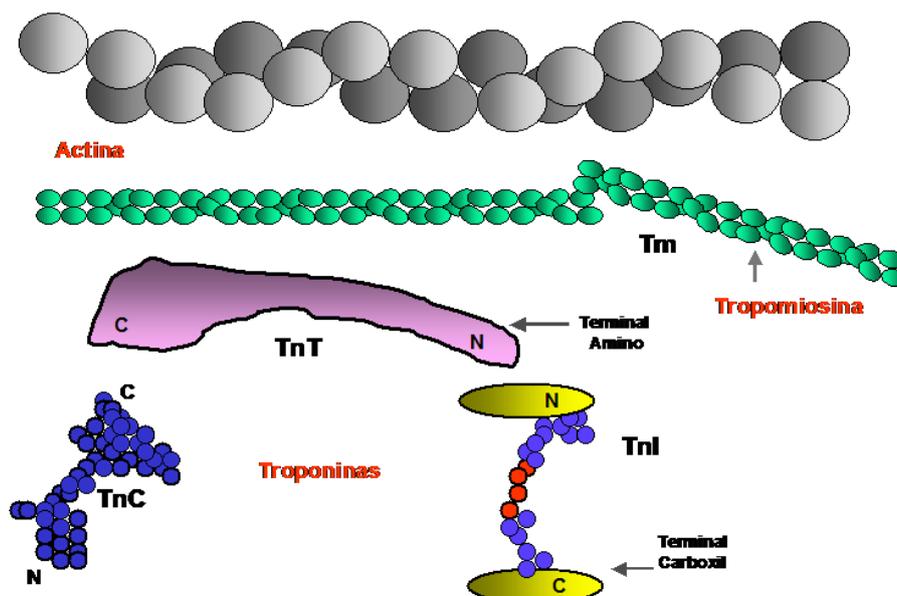


Figura 3 - Miofilamento: Actina. Desenho representativo do complexo estrutural da actina. (Fonte: Solaro & Rarick, 1998).

## 2 – Regulação da Atividade das Proteínas Contráteis

A regulação primária da contração do músculo estriado e cardíaco de mamífero ocorre no filamento fino. Quando o cálcio livre citosólico se eleva, ele se liga ao complexo troponina, o qual, por sua vez, altera o filamento fino de forma a possibilitar que a miosina se combine com a actina e gere tensão. A ocupação da troponina C pelo cálcio, fortalece a ligação entre a troponina C e a troponina I e, dessa forma, diminuindo a interação negativa da troponina I com a actina, causando uma alteração molecular na tropomiosina, a qual se torna menos inibitória à interação actina-miosina (Brenner, 1988; Rüegg, 1990).

De acordo com Brenner (1988), é predominantemente a frequência de ligação de pontes cruzadas que é afetada pelo cálcio. Dessa forma, qualquer aumento na concentração de cálcio livre no mioplasma poderá aumentar a ocupação da troponina C pelo cálcio o que, por sua vez, aumenta a probabilidade de ligações de pontes cruzadas. Portanto, o primeiro efeito dos íons cálcio poderia ser um aumento da força desenvolvida (Rüegg, 1990).

Em contraste, Hancock et al., (1993) propuseram que os íons cálcio interagindo com a troponina C atuariam mais aumentando a disponibilidade de sítios de ligação para a miosina no filamento de actina do que alterando a frequência de transição entre os estados das pontes cruzadas. Na verdade, essas duas propostas, aparentemente divergentes, não seriam tão diferentes,

visto que o cálcio promove a ligação da miosina à actina, um efeito que também altera a configuração molecular da cabeça da miosina e, em consequência, o grau de interação miosina-actina (Rayment et al., 1993).

Normalmente, a concentração mioplasmática de íons cálcio durante a sístole é tal que os sítios contráteis estão ativados em 50% de sua totalidade. Dessa forma, o coração tem ainda uma considerável reserva contrátil, a qual poderia ser explorada pelo aumento da ocupação da troponina C pelo cálcio. O desenvolvimento da força poderia, em última instância, depender da quantidade de cálcio liberado do retículo sarcoplasmático e ofertado a troponina C, o que poderia explicar o aumento da força de contração durante estimulação por catecolaminas (Opie, 1995). A estimulação  $\beta$ -adrenérgica atua tanto indiretamente através do AMPc ou mais diretamente aumentando a concentração citosólica de cálcio através do aumento da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  e pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Um aumento da frequência de ligação de pontes cruzadas aumenta a velocidade de desenvolvimento de tensão,  $dF/dt$ . Este é o efeito inotrópico positivo. A velocidade de relaxamento,  $(-dF/dt)$  também será aumentada. Este efeito lusitrópico é explicado por dois fatores: primeiro, a fosforilação do fosfolamban ativa o transporte de cálcio para dentro do retículo sarcoplasmático de tal forma, que o cálcio livre citosólico será diminuído mais rapidamente na presença de catecolaminas (Katz, 1979) e, segundo, a ativação  $\beta$ -adrenérgica diminui a sensibilidade do miofilamento ao cálcio devido a fosforilação da TnI e a consequente redução da afinidade da TnC ao cálcio (Katz, 1979; Li *et al.*, 2000).

A constante da velocidade de dissociação do complexo troponina C- $\text{Ca}^{2+}$  é grandemente aumentado quando a troponina I é fosforilada pela PKA (Holroyde *et al.*, 1980). O significado fisiológico dessa fosforilação é o fato de que a contração pode ser desativada mais rapidamente quando o cálcio diminui no início da diástole, o que contribui para um aumento do relaxamento. A troponina T também pode desenvolver uma fosforilação similar em resposta a estimulação pela proteína quinase C (PKC), sendo esta última formada no sistema de sinalização desencadeado por estimulação  $\alpha_1$ -adrenérgica. Tal fosforilação da troponina T fornece resultados inibitórios similares àqueles obtidos pela fosforilação da troponina I (Holroyde *et al.*, 1980).

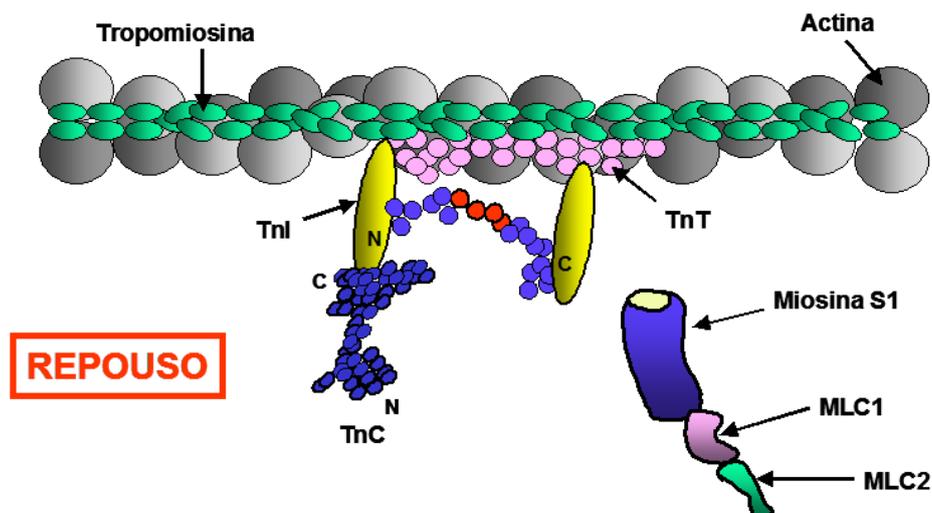


Figura 4 – A Condição de Repouso. Na condição de repouso, o Carboxi terminal da TnI está ligado à actina, desta forma, ancorando o complexo TnT-tropomiosina (Tm) e, impedindo que a cabeça da miosina (S1) se ligue à actina (Fonte: Solaro & Rarick, 1998).

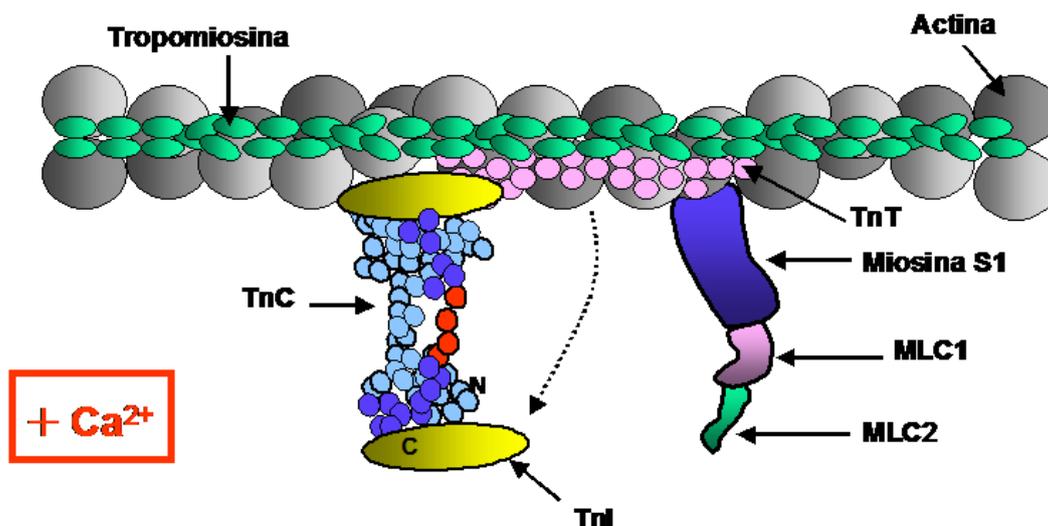


Figura 5 – Os Miofilamentos em Presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Quando o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga ao terminal amino do TnC, esta região se liga fortemente ao terminal carboxila do TnI, a qual se desloca da actina permitindo que o complexo TnT-Tm se desloque para o fundo da fenda formada pela actina e, conseqüentemente, exponha os sítios situados ao longo da actina aos quais irão interagir com sítios de ligação do subfragmento das cabeças S1 da miosina. (Fonte: Solaro & Rarick, 1998).

### 3 – Biologia Molecular dos Canais de Cálcio dos Miócitos Cardíacos

Os íons cálcio são importantes mensageiros intracelulares do sistema cardiovascular. A homeostase do cálcio é regulada através: (1) de um ciclo extracelular, o qual controla a entrada e a remoção do cálcio entre o citosol e o espaço extracelular; (2) e um ciclo intracelular, o qual controla os fluxos entre o

citossol e o retículo sarcoplasmático. A sinalização do cálcio no sistema cardiovascular é mediada por diversas famílias de proteínas. Tais processos incluem as proteínas que regulam a entrada do cálcio no citossol, as proteínas que reconhecem o cálcio assim que ele entra no citossol e, as proteínas que removem o cálcio do citossol. As proteínas que regulam o fluxo de cálcio para dentro do citossol incluem os canais de liberação do cálcio intracelular e os canais de cálcio da membrana plasmática (Katz, 1996a, b).

### **3.1- Proteínas que Regulam o Influxo Celular de Cálcio**

Dois famílias de proteínas regulam a entrada de cálcio para dentro do citossol: **a)** Uma família inclui os canais de liberação de cálcio intracelular (do RS) e, **b)** a outra família constitui os canais de cálcio da membrana plasmática.

#### **I) Canais de cálcio da membrana plasmática**

O cálcio entra na célula através dos canais de cálcio voltagem-dependentes localizados na membrana plasmática os quais, participam do ciclo extracelular do cálcio. Os canais de cálcio tipo-L da membrana plasmática são os mais abundantes membros dessa família nos miócitos cardíacos e contribuem tanto para a formação do “*plateau*” como para o acoplamento excitação-contracção (Katz, 1996a, b) (Tsien & Tsien, 1990).

Os canais de cálcio da membrana plasmática são membros de uma grande família de canais iônicos onde se incluem os canais de sódio, os canais de potássio e os canais de cloreto. Todos esses canais compartilham uma estrutura muito similar.

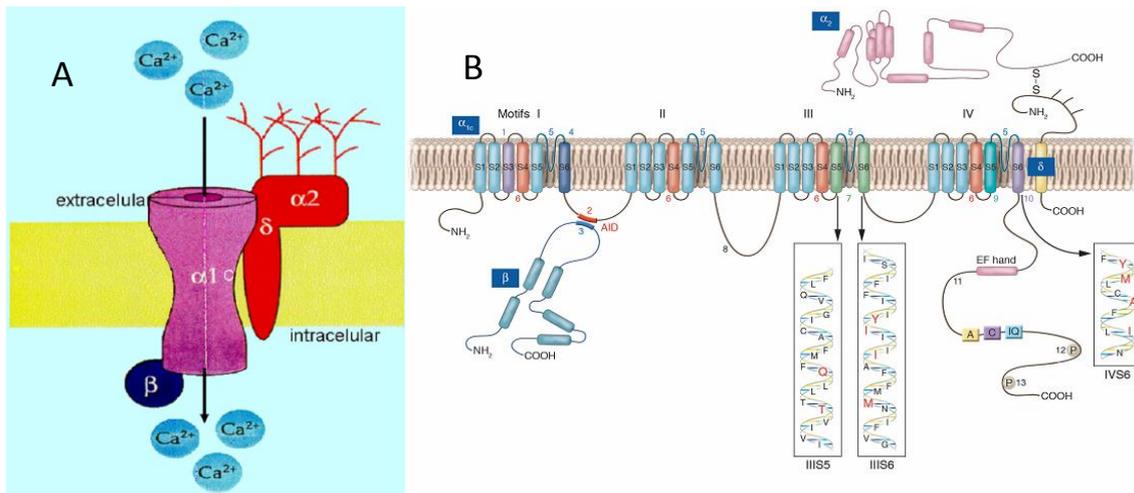


Figura 6 – (A) O Canal de Cálcio. Desenho representativo de um canal lento de cálcio mostrando suas respectivas subunidades circundando o poro central (Fonte: Perez – Reyez & Schneider, 1995). (B) Estrutura dos Canais Lentos de  $Ca^{2+}$  (CACNA1C). Subunidade  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\delta$ . Subunidade  $\alpha_1$  formada por quatro Domínios e cada um deles composto por seis segmentos transmembrana. Subunidade  $\alpha_2$  com disposição não citosólica e ligada à subunidade  $\delta$  por pontes dissulfeto. Subunidade  $\delta$  com um único segmento transmembrana. Subunidade com disposição citosólica, ligada por um domínio de interação peptídica citosólico a subunidade  $\alpha_1$  entre os domínios I e II (Fonte: Bodi et al., 2005).

### a) Receptores Diidropiridínicos (DHPRs)

Na década de 70, com a utilização de métodos de microscopia eletrônica, foi possível identificar uma proteína, transmembrana, classificada como um polipeptídico heterotetrâmero (Block et al., 1988) composto por 5 (cinco) subunidades, sendo  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\delta$ ,  $\beta$  e, em alguns tecidos, também existe a subunidade  $\gamma$  (Bodi et al., 2005). No músculo esquelético os canais lentos de  $Ca^{2+}$  (CACNA1C) são formados pelas subunidades  $\alpha_{1s}$ ,  $\alpha_2$ ,  $\delta$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Entretanto, no músculo cardíaco o canal é formado apenas pelas subunidades  $\alpha_{1c}$ ,  $\alpha_2$ ,  $\delta$  e  $\beta$ , sendo que a subunidade  $\alpha_1$  é acrescida da letra “c” para definir os canais de Músculo Cardíaco e da letra “s” para definir os canais de Músculo Esquelético, e acrescida da letra (Bodi et al., 2005).

A subunidade  $\alpha_{1c}$  (170-240 kDa) consiste de 4 (quatro) domínios homólogos (I-IV) sendo que cada domínio é formado por 6 (seis) segmentos transmembrana em  $\alpha$ -hélice, definidos com S1, S2, S3, S4, S5 e S6. Entre os segmentos S3 e S4 encontra-se a sequência peptídica responsável pela ativação cinética do canal. Tal sequência peptídica tem característica voltagem-dependente e o segmento S4 é considerado como sendo o sensor de voltagem.

Os segmentos S5 e S6, quando ativados pela alteração de voltagem da membrana, sofrem uma alteração em sua conformação proteica com consequente formação de um canal seletivo a íons, mais especificamente, a íons  $\text{Ca}^{2+}$ . No segmento S6 encontra-se a sequência peptídica responsável pela inativação do canal (Tsien & Tsien, 1990; Cheng et al., 1993). A comunicação entre os *domínios* ocorre através de uma ligação peptídica citosólica entre S6 e S1 do *domínio* seguinte. A sequência peptídica de ligação entre os *domínios* I e *domínio* II também tem função de união entre a subunidade  $\alpha_{1c}$  e  $\beta$  (Bodi et al., 2005; Yokoyama et al., 2005).

A subunidade  $\alpha_2$ , com localização extracelular (Ahlijamian et al., 1990), está ligada a subunidade  $\delta$  por interação na superfície celular através de pontes dissulfeto. A subunidade  $\delta$  é formada por um único segmento transmembrana junto ao *domínio* IV da subunidade  $\alpha_{1c}$  (De Jongh et al., 1989). A expressão incorreta destas subunidades pode levar ao desenvolvimento de bradicardias (Ivanov et al., 2004). Quando as subunidades  $\alpha_2$  e  $\delta$  são expressas em conjunto com a subunidade  $\alpha_{1c}$  ocorre um incremento dos sítios de ligação do Receptor Diidropiridínico (DHPR) e das correntes iônicas (Singer et al., 1991; Wei et al., 1995; Bangalore et al., 1996). Tal fato indica que estas subunidades apresentam papel importante na formação e função destes canais na superfície da membrana (Bers, 2001) aumentando a afinidade do canal ao composto diidropiridínico (Wei et al., 1995).

Quatro isoformas da subunidade foram descritas ( $\beta_1 - \beta_4$ ), entretanto a isoforma encontrada no músculo cardíaco é  $\beta_2$  (De Waard et al., 1994; Perez-Reyes & Schneider, 1995;). São estruturas hidrofílicas, não glicosiladas e localizadas no citosol; não apresentam segmentos transmembrana e ligam-se à subunidade  $\alpha_{1c}$  entre os *domínios* I e II (De Warrd et al., 1994).

## **II- Canais de cálcio da membrana do retículo sarcoplasmático**

### **a) Receptores de Rianodina (RyRs)**

Anatomicamente, o retículo sarcoplasmático (RS) se constitui em uma rede espalhada através dos miócitos e demarcada por sua bicamada lipídica similar àquela do sarcolema (Page et al., 1971). A principal função desta organela parece ser o sequestro e a liberação de cálcio para o citoplasma (Winegrad, 1965).

Na década de 80, através de técnicas de microscopia eletrônica, foi possível identificar a presença de estruturas proteicas transmembrana dispostas no RS (Dulhunty, 2006). Com o uso de um alcaloide naturalmente encontrado no caule da planta *Ryanna speciosa*, denominado de rianodina, foi possível identificar a função destas estruturas (Elison & Jenden, 1967; Jenden & Fairhurst, 1969). Experimentos com a utilização deste composto alcaloide induzia a uma potente paralisação da atividade contrátil muscular, entretanto com efeitos diferentes em relação a músculos esqueléticos e músculos cardíacos. A ação deste composto sobre o músculo esquelético induzia uma paralisação total da capacidade de contração, porém em músculos cardíacos o mesmo não ocorria (Elison & Jenden, 1967; Fairhurst, 1973).

Com bases em suas diferenças morfológicas e alta afinidade pelo alcaloide rianodina, essas proteínas, uma vez purificadas, foram então identificadas, no músculo, como canais liberadores de  $Ca^{2+}$  do RS (receptores rianodínicos, RyR) (Lai et al., 1988; Inui et al., 1987a, b). Três isoformas diferentes foram identificadas inicialmente, RyR1 em músculos esqueléticos, RyR2 em músculos cardíacos, RyR3 que inicialmente foi identificado em células cerebrais, entretanto, mas tarde foram encontrados também em outros tecidos (Meissner, 1986; Inui et al., 1987).

As estruturas identificadas por Franzini-Armstrong como pés são então identificadas como os DHPR e RyR. Block et al. (1988) demonstrou que esses pés são organizados num padrão distinto no RS imediato a membrana do túbulo-T e que estão em oposição a um organizado arranjo de partículas na membrana do túbulo-T semelhante à proteína de canal de  $Ca^{2+}$  do sarcolema (receptor diidropiridínico, *DHPR*). Esse arranjo em músculo cardíaco de mamífero, apresenta uma estequiometria RyR:DHPR 4:10 dependendo da espécie (Bers & Stiffel, 1993; Wibo et al., 1991). É importante observar também, que na musculatura esquelética os receptores diidropiridínicos não funcionam como canais de  $Ca^{2+}$  mas atuam, durante a despolarização, como elemento que

promove o aumento de permeabilidade dos canais de rianodina do RS. Além disso, na musculatura esquelética, o volume de RS é significativamente maior do que no miocárdio, o que explica a grande independência da função contrátil em relação ao  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Bers & Stiffel, 1993; Wibo et al., 1991)

### **b) Receptores $\text{IP}_3$ ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ )**

A membrana do RS não compreende apenas a expressão dos RyR. Os  $\text{IP}_3\text{Rs}$  (Receptores de Inositol 1,4,5-trifosfato ou  $\text{InsP}_3\text{Rs}$ ) também são expressos em sua membrana. Os receptores de inositol trifosfato são predominantes no músculo liso onde eles medeiam o acoplamento fármaco-mecânico. Nesse processo, a droga que se liga aos receptores da membrana libera o cálcio ativador que inicia a contração.

O receptor  $\text{IP}_3$  é muito semelhante ao receptor rianodínico (RyR) e, em conjunto, eles formam uma superfamília de canais intracelulares liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$ . O  $\text{IP}_3\text{R}$  foi inicialmente isolado do tecido neural (Supattapone et al., 1988) e de músculo liso (Chadwick et al., 1990). A clonagem do  $\text{IP}_3\text{R}$  neuronal mostrou a existência de uma sequência homóloga aos RyRs (Furuichi et al., 1989; Mignery et al., 1989). Em 1990, Chadwick et al., mostraram que os  $\text{IP}_3\text{Rs}$  têm uma estrutura quaternária como os RyRs de músculo esquelético (a despeito do menor peso molecular) e, além disso, foi sugerido apresentarem um arranjo tetramérico. Existe 3 subtipos de  $\text{IP}_3\text{R}$ : tipo 1; tipo 2 e tipo 3. O tipo 1 de  $\text{IP}_3\text{R}$  é predominantemente presente em músculo liso e tecido neuronal. Os tipos 2 e 3 também foram clonados e são homólogos ao tipo 1 em 69 e 64% respectivamente (Südhof et al., 1991; Blondel et al., 1993). Estudos examinaram a expressão e a localização subcelular das isoformas do  $\text{IP}_3\text{R}$ , bem como, investigaram o potencial papel deles na modulação do processo de AEC de músculo cardíaco. Análises por Western blot, PCR e  $\text{IP}_3$ -ligação indicam que tanto os miócitos atriais como os ventriculares expressam, principalmente, o tipo 2 de  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , com uma população de aproximadamente 6 vezes mais  $\text{IP}_3\text{Rs}$  nas células atriais. Nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que esses canais são funcionais e estão localizados nas mesmas regiões celulares que os

RyRs juncionais os quais, estão envolvidos no processo de AEC (Lipp et al., 2000).

Em 1984, Hirata et al., foram os primeiros a demonstrarem a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  em vesículas de RS de músculo cardíaco. Entretanto, outros autores demonstraram nenhum efeito do  $\text{IP}_3$  tanto sobre o RS isolado de músculo cardíaco quanto em miócito permeabilizado pela saponina. Em 1986, Nosek et al., demonstraram que o  $\text{IP}_3$  era capaz de potencializar em músculo cardíaco tanto a liberação espontânea de  $\text{Ca}^{2+}$  quanto a induzida por cafeína. Fabiato (1986a, b; 1990) mostrou que a rápida aplicação de  $\text{IP}_3$  em miócitos desmembranados de rato poderia induzir a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , mas que esta seria muito menor e muito mais lenta que a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo processo de CICR. Estes dados foram confirmados em trabalhos com fibras desmembranadas de músculo ventricular de rato (Kentish et al., 1990).

O papel biológico desta família de receptores em tecidos cardíacos está pouco esclarecido. Apesar do receptor  $\text{IP}_3$  não ser o principal canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  em músculo cardíaco, o  $\text{IP}_3$  pode estar envolvido na regulação da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$ . O aumento de  $\text{IP}_3$  e o resultante aumento da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser um importante mecanismo no controle da força contrátil cardíaca em resposta a fatores hormonais e farmacológicos bem como em estados patológicos (Go et al., 1995).

No músculo cardíaco, o receptor de rianodina atua como o principal canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS no processo de acoplamento excitação-contração (Smith et al., 1989; Gyorke & Fill, 1993). Tem sido demonstrado que a ativação do fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato o qual está acoplado aos receptores  $\alpha$ -adrenérgico e muscarínico da membrana plasmática, é capaz de aumentar o nível de  $\text{IP}_3$  no músculo cardíaco (Scholz et al., 1988). Estudos iniciais revelaram que em uma preparação vesicular de RS o  $\text{IP}_3$  era capaz de induzir uma lenta liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  bem como ativar a contração em preparações com fibra muscular ventricular desmembranada de rato e de coração de galinha (Hirata et al., 1984).

Os  $\text{IP}_3\text{Rs}$  possuem três domínios transmembrana, um sítio de ligação, um de engate e um que forma o canal (Mignery & Südhof, 1990; Südhof et al., 1991). A sequência e domínios são similares nos três tipos, entretanto são regulados diferentemente por  $\text{InsP}_3$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Os  $\text{IP}_3\text{R}$  do tipo 2, que são mais

expressos nos miócitos atriais, tem grande afinidade ao composto  $\text{InsP}_3$  (Perez et al., 1997; Ramos-Franco et al., 1998), enquanto que os  $\text{IP}_3\text{R}$ s do tipo 1 tem 4 vezes menos afinidade e os  $\text{IP}_3\text{R}$ s do tipo 3 tem aproximadamente 10 vezes menos afinidade (Hagar & Ehrlich, 2000). A ativação do  $\text{IP}_3\text{R}$  também é sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  entretanto, a ativação mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  está associada diferentemente em relação às isoformas do tipo 1, enquanto que os  $\text{IP}_3\text{R}$  do tipo 2 e 3 não são ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Bezprozvanny et al., 1991). Os  $\text{IP}_3\text{R}$  do tipo 2, muito expressos em miócitos cardíacos, especialmente, em átrios, são muito mais sensíveis ao  $\text{InsP}_3$  e quase insensíveis as alterações fisiológicas da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , atuando assim, nos miócitos cardíacos, mais como um sensor de  $\text{InsP}_3$  (Bers, 2001).

A capacidade de condutância do canal  $\text{IP}_3\text{R}$  é aproximadamente metade da encontrada em canais RyR, entretanto e seletividade para cátions bivalentes, como é o caso dos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , é similar a encontrada nos canais RyR (Bezprozvanny & Ehrlich, 1995). Um potente regulador da ativação destes canais, de forma inibitória, é a heparina, que tem capacidade de alterar a conformação proteica dos sítios de ligação impedindo a sensibilização via  $\text{InsP}_3$ . Por outro lado, as Proteínas Dependentes de cAMP (PKA) que são fosforilativas, são capazes de aumentar a sensibilização dos canais  $\text{IP}_3\text{R}$  induzida por  $\text{InsP}_3$ , entretanto não se sabe mais sobre outras proteínas de fosforilação (Burgess et al., 1991). Além disso, a FKBP é capaz de ligar-se aos sítios de ligação do  $\text{InsP}_3$  diminuindo a sensibilização dos canais  $\text{IP}_3\text{R}$ , formando então um complexo FKBP- $\text{IP}_3\text{R}$  calcineurina (Cameron et al., 1995). Calmodulina é outra proteína regulatória da atividade dos canais  $\text{IP}_3\text{R}$ , com sítios de ligação nos tipos 1 e 2 (Yamada et al., 1995).

A ligação do  $\text{InsP}_3$  com os canais  $\text{IP}_3\text{R}$  ocorre no domínio transmembrana denominado de *sítio de ligação* que foi inicialmente caracterizado a partir de seu amino terminal ( $\text{NH}_2$ ) por Mignery e col (1989) e baseado na descoberta de 410 resíduos com característica complementar ao  $\text{InsP}_3$  (Moraru et al., 1999). Experimentos realizados após a descoberta de Mignery e col. Indicaram que esta característica do amino terminal era particular a todas isoformas de  $\text{IP}_3\text{R}$  (Sudhof et al., 1991; Maranto, 1994; Morris et al., 2002). Em 1996, Yoshikawa et al. identificaram uma sequência de 10 resíduos de arginina e lisina, distribuídos por todo o domínio, como sendo aminoácidos

com papel muito importante na ligação do  $\text{InsP}_3$  ao canal  $\text{IP}_3\text{R}$ , em especial os resíduos Arg-265, Lys-508 e 511, talvez sendo, o último, o mais importante para essa ligação.

O *Poros* dos canais  $\text{IP}_3\text{R}$  foi estabelecido por técnicas de imunocitoquímica e por análises de N-Glicosilação em comprimento total (Galvan et al., 1999; Michikawa et al., 1994). Os dados destes estudos aliados a uma analogia entre o modelo de canais  $\text{IP}_3\text{R}$  a partir dos canais RyR, sugeriram que o carboxi-terminal (COOH) em  $\alpha$ -hélice estava envolvido na permeabilidade aos íons. A interação entre  $\text{InsP}_3$  e seu sítio de ligação no canal  $\text{IP}_3\text{R}$ , induz alteração na conformação da proteína dos segmentos transmembrana em  $\alpha$ -hélices 5 e 6. Tal alteração é capaz de criar a estrutura básica para formação do poro (Michikawa et al., 1994; Williams et al., 2001; Taylor, Fonseca e Morris, 2004). Em 1999, Ramos-Franco et al. realizaram experimentos em que induziam a supressão dos quatro primeiros segmentos transmembrana em  $\alpha$ -hélice dos canais  $\text{IP}_3\text{R}$  e deixando ativos apenas os segmentos 5 e 6. Mesmo sem a presença dos segmentos anteriores o canal foi formado com condutância, seletividade e propriedades que confirmaram o modelo proposto. Além disso, a homologia de sequências entre os canais RyRs e canais  $\text{IP}_3\text{Rs}$  em relação a formação dos poros, sugerem que os estudos com RyRs são importantes para determinação molecular dos canais  $\text{IP}_3\text{Rs}$  (Boehning et al., 2001).

### 3.2 – Proteínas que Removem o Cálcio do Citosol

O RS também contém *calsequestrina*, uma proteína de grande capacidade de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Ostwald & MacLennan, 1974) a qual está especialmente concentrada na cisterna terminal (Meissner, 1975).

Duas teorias foram propostas para explicar o mecanismo de liberação de íons cálcio pelo RS: 1) empregando-se o RS isolado de músculos esquelético e cardíaco, tem-se demonstrado que essa liberação é, dentro de certos limites, função do gradiente de concentração do cálcio livre através da membrana dessas vesículas (Fabiato & Fabiato, 1975). Esses dados sugerem que o aumento da atividade de íons cálcio livre no meio citoplasmático pode promover a liberação do íon cálcio armazenado no RS. Essa é a teoria da "liberação de

cálcio induzida por cálcio" (*calcium induced calcium release*) (Fabiato & Fabiato, 1977; 1983); 2) a outra teoria proposta é a que a liberação de cálcio pelo RS seria decorrente da despolarização de suas membranas. Nesta teoria, assume-se que o interior da vesícula seria polarizado positivamente em relação ao seu exterior (Constantin et al., 1977). Todavia, esta última não tem sido aceita.

Dados visando avaliar a capacidade do RS em captar e armazenar cálcio indica que a quantidade liberada é suficiente para desencadear o processo de contração muscular e, sua recaptção, é suficiente para induzir o relaxamento muscular em coração com batimentos normais (Vaughan-Jones, 1986). Essa recaptção de cálcio pelo RS requer ATP e é bloqueado por ionóforos de íons cálcio, sugerindo a existência de uma bomba de cálcio localizada nas membranas dessa organela (Chapman, 1983; Vaughm-Jones, 1986).

#### **4 – Processo de Acoplamento Excitação-Contração (AEC)**

O acoplamento excitação-contração cardíaco é o processo desde a excitação elétrica do miócito até a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, que resultará na contração do coração (Bers, 2002). O segundo mensageiro cálcio é essencial na atividade elétrica cardíaca e é o ativado direto dos miofilamentos que causam a contração (Bers, 2002). Numa visão geral, o processo de AEC pode sugerir eventos que levam até a finalização do movimento contrátil, entretanto, a conceitualização correta do processo de AEC corresponde a todos os eventos iniciados com a despolarização da membrana, seja em células musculares esqueléticas, lisas ou cardíacas, até a resultante liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (Dulhunty, 2006).

Dessa forma, a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS é de importância crucial para o processo de AEC. Tem sido relatado que alterações da concentração de cálcio no miócito é a causa central tanto da disfunção contrátil como de arritmias em condições patofisiológicas (Sordahl et al., 1973; Pogwizd et al., 2001).

No músculo cardíaco o principal mecanismo envolvido na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  através do RS é o receptor ou canal de rianodina,  $\text{RyR}_2$  (Ogawa, 1994; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997).

Numerosas estruturas celulares estão envolvidas no processo de AEC de músculo cardíaco, mas como já mencionado, os eventos iniciam-se com a

despolarização da membrana, que pode ser tanto elétrica (voltagem dependente) quanto por ação química (ligante dependente). Nos miócitos cardíacos, a despolarização da membrana desencadeia alterações conformacionais que abrem os canais de cálcio voltagem-dependentes (DHPRs) os quais possibilitam o influxo rápido de cálcio (Katz, 1992; Clapham, 1995). Apenas uma pequena quantidade de cálcio que influi no citosol a partir do espaço extracelular ativa o miocárdio adulto já que, a maior parte deste cálcio “ativador” se acumula logo abaixo da membrana plasmática, adjacente aos canais liberadores de cálcio localizados no retículo sarcoplasmático (RyRs). Este acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  dispara a liberação de uma quantidade maior de cálcio a partir do retículo sarcoplasmático, mecanismo esse identificado com “liberação de cálcio induzida por cálcio” (*calcium-induced calcium release, CICR*) (Clapham, 1995; Fabiato, 1983). O cálcio presente, nesse momento no citosol, é considerado como aquele responsável pela ativação dos miofilamentos contráteis (Clapham, 1995; Fabiato, 1983).

Uma segunda via tem sido proposta com um mecanismo que contribui ao mecanismo de CICR cardíaco, o *trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$*  (Bridge et al., 1990). Este trocador, representa um mecanismo pelo qual os movimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  através do sarcolema estão acoplados a movimentos recíprocos de  $\text{Na}^+$ ; com uma estequiometria de  $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$  (Brenner, 1993). A direção na qual se realiza a troca depende fundamentalmente do gradiente eletroquímico para o  $\text{Na}^+$  e para o  $\text{Ca}^{2+}$ . Na condição de repouso (diástole) o trocador utiliza o gradiente eletroquímico que favorece a entrada de  $\text{Na}^+$  para célula e a saída de  $\text{Ca}^{2+}$  desta atuando, portanto, nesse momento, como uma via de saída do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Nessa condição, é dito que o trocador estaria atuando no seu modo direto ou *forward*. Entretanto, quando ocorre a despolarização e a subsequente alteração do gradiente eletroquímico, o que induz também uma alteração na atividade do trocador, invertendo sua direção, ou seja, influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e efluxo de  $\text{Na}^+$ . Nessa condição, é dito que o trocador estaria atuando no seu modo inverso ou *reverse*. Nesse modo de atuação, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  atuaria contribuindo para o mecanismo de *liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$* . Obviamente, ao estar atuando no seu modo direto ou *forward*, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  estaria contribuindo para o processo de relaxamento muscular (Brenner, 1993; Sham et al., 1995).

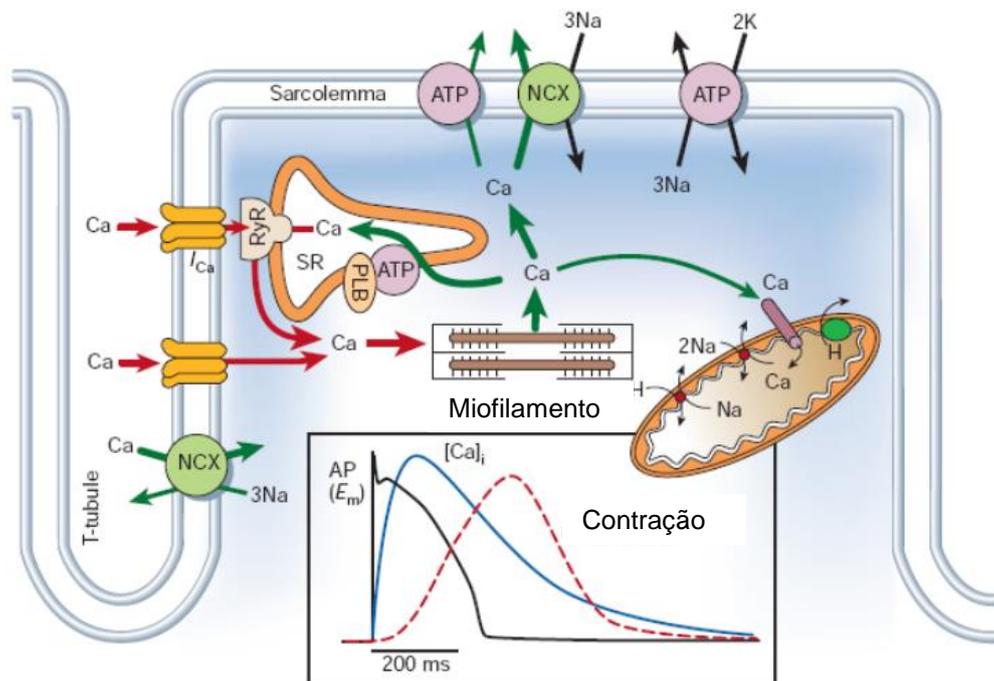


Figura 7 – *Cálcio que induz a liberação de cálcio (CICR)*. Desenho esquemático representando o processo de AEC por CICR. Canais lentos de  $\text{Ca}^{2+}$  permitem o influxo deste íon durante a despolarização da membrana aumentando sua concentração citosólica, que por sua vez, altera a atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . O cálcio citosólico ao ligar-se aos RyRs induz a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado no RS (Fonte: Bers, 2002).

Embora, via de regra o processo de AEC seja descrito como o fizemos até aqui, na verdade a variedade e a complexidade das estruturas envolvidas nesse processo nos mostram algumas diferenças e complexidades substanciais. Ao contrário do observado nos miócitos ventriculares, os miócitos atriais apresentam um sistema tubular pobre (Hüster et al., 1996; Lipp et al., 1996a, b) e o acoplamento entre os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (DHPRs) localizados no sarcolema e os RyRs na porção “juncional” do RS ocorre próximo da periferia da célula (Lipp et al., 1990; Berlin, 1995; Carl et al., 1995; Hüster et al., 1996). Estudos anteriores indicaram que a elevação da concentração atrial de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre inicialmente na região subsarcolemal, seguida por um variável grau de propagação do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  para as camadas mais internas do miócito atrial (Lipp et al., 1990; Berlin, 1995; Hüster et al., 1996). A modulação espacial para a sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  é crítica para a determinação da atividade fisiológica da célula. Diferentes tipos de células dispõem sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  em área local e/ou global para que possam ativar diferentemente os processos celulares (Bootman et al., 2001; Marchant & Parker, 2000). Foi demonstrado que os

cardiomiócitos atriais alteram as propriedades espaciais de suas sinalizações de  $\text{Ca}^{2+}$  para modular a contratilidade. Os ventrículos são os principais efetores do bombeamento e enchimento de forma passiva devido à pressão do retorno venoso. Entretanto, a contração dos átrios contribui com ~20% do volume de sangue ventricular antes destes se contraírem. A contribuição dos átrios ganha importância gradativamente maior com a idade ou sob condições de estresse (Mackenzie et al., 2004).

O processo de AEC é iniciado na periferia da célula onde os DHPRs e os RyRs estão justapostos. Na maioria das células, a resposta ao  $\text{Ca}^{2+}$  está limitada ao espaço subsarcolemal. Desde que ele não ocorre nas áreas vizinhas da maquinaria contrátil, o sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  da porção juncional dispara apenas um modesto abalo. A ausência de uma propagação para o interior da resposta subsarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$  torna-se surpreendente já que os miócitos atriais expressam abundantemente os RyRs não-juncionais, os quais são funcionais e claramente têm acesso a estoques substanciais de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os principais mecanismos que atuam limitando a difusão do  $\text{Ca}^{2+}$  são a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA) e a mitocôndria (Mackenzie et al., 2004). A razão para que as SERCAs e as mitocôndrias afetem a propagação intracelular do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  mas não o início do processo de CICR na periferia da célula é, muito provavelmente, a proximidade entre os DHPRs e os RyRs subsarcolemais (~ 20 nm) em comparação à distância que existe entre os agrupamentos de RyRs ao longo da célula (~2  $\mu\text{m}$ ). Todavia, manipulação farmacológica na sensibilidade dos RyRs através do processo de CICR, ou aumentando o fluxo do  $\text{Ca}^{2+}$  disparador, possibilitam ao sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  subsarcolemal recrutar RyRs centrais. Isto leva a uma amplificação do sinal global de  $\text{Ca}^{2+}$  resultando no aumento substancial na força de contração. Dessa forma, pesquisadores sugerem que os RyRs não-juncionais estão posicionados num local estratégico e que os habilitam a responder durante o processo de AEC (Mackenzie et al., 2004). Em condições de controle, a sensibilidade dos miócitos atriais ao processo de CICR é insuficiente para que eles sejam ativados pela quantidade limitada de  $\text{Ca}^{2+}$  que não é re-capitado pela SERCA e mitocôndria. Entretanto, mesmo uma modesta sensibilização, por exemplo, usando baixas concentrações de cafeína torna-os responsivos. A mesma modificação global sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  é responsável

pelo efeito inotrópico positivo da estimulação por endotelina-1 (ET-1); agonista  $\alpha$ -adrenérgico (fenilefrina) ou agonista  $\beta$ -adrenérgico (isoproterenol). Além do mais, em contribuição ao enchimento ventricular, os miócitos atriais secretam hormônios tais como o peptídeo natriurético atrial (ANP). Dentre todos esses sinais, a via de transdução de sinal relacionando a resposta dos miócitos atriais à agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos são as menos esclarecidas. (Mackenzie et al., 2004).

Apesar da grande evidência de que o influxo de cálcio é essencial para o processo de acoplamento excitação-contração do músculo cardíaco, alguns estudos têm sugerido a existência de um mecanismo voltagem-dependente de liberação de cálcio o qual não requer o influxo de cálcio (Ferrier & Howlett, 2001). Todavia, alguns importantes trabalhos têm se posicionado contrários à esta hipótese, todavia, até o momento, nada ainda foi comprovado de forma definitiva (Wier & Balke, 1999; Piacentino et al., 2000).

O Inositol (1,4,5)-trifosfato ( $\text{InsP}_3$ ) pode disparar a liberação de cálcio do RS de músculo liso bem como do retículo endoplasmático de muitos tipos de células, por meio dos receptores  $\text{InsP}_3$ . Existem receptores  $\text{InsP}_3$  nos miócitos ventriculares (basicamente isoforma 2) (Perez et al., 1997; Lipp et al., 2000). Apesar de uma elevada concentração de  $\text{InsP}_3$  poder liberar cálcio nos miócitos cardíacos (particularmente nas células atriais, as quais apresentam muito maior expressão de receptores  $\text{InsP}_3$ ) a frequência e a intensidade de liberação de cálcio é muito menor do que o observado no mecanismo de CICR e, os potenciais de ação são sabidos não estimularem a produção de  $\text{InsP}_3$  (Kentish et al., 1990). Além disso, agonistas cardíacos  $\alpha$ -adrenérgicos e muscarínicos aumentam a produção de  $\text{InsP}_3$  e a força de contração (Brown & Jones, 1986; Poglioli et al., 1986), todavia, esse efeito inotrópico é mediado principalmente pela proteína cinase C (PKC) do que pelo  $\text{InsP}_3$  (Endoh, 1996; Gambassi et al., 1998).

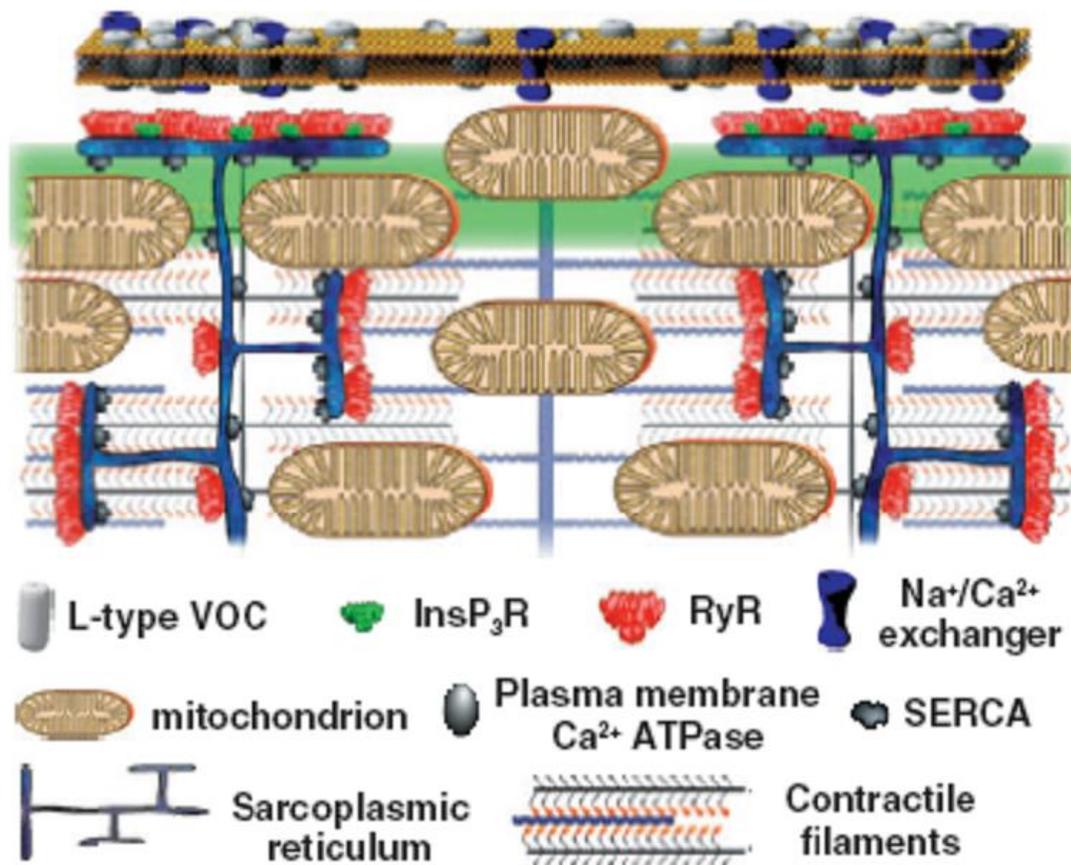


Figura 8 - Maquinaria de sinalização do Ca<sup>2+</sup> nos miócitos atriais. A figura mostra nos miócitos atriais, o arranjo específico dos componentes envolvidos na sinalização do Ca<sup>2+</sup> que contribuem para a geração e modulação dos sinais do Ca<sup>2+</sup> no miócito atrial. A banda verde do desenho delimita a zona na qual o sinal de Ca<sup>2+</sup> deve cruzar no sentido de recrutar os RyRs centrais e disparar a contração. (Fonte: Mackenzie et al., *Journal of Cell Science*, 117, 6327-6337, 2004).

#### 4.1– Acoplamento excitação-contração e a via de receptores Inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>Rs)

O inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) é um importante segundo mensageiro na regulação da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> (Berridge and Irvine, 1984; 1989). A ativação de determinados receptores da membrana plasmática acoplados à proteína G induz a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), com a consequente formação de IP<sub>3</sub> e à subsequente liberação de Ca<sup>2+</sup> de estoques intracelulares. Nos últimos anos, estudos importantes têm contribuído com avanços significativos para uma compreensão melhor das bases moleculares para a liberação de Ca<sup>2+</sup> via IP<sub>3</sub>. Dentre tais avanços, podemos salienta a descoberta dos IP<sub>3</sub>Rs os quais são liberadores de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Moschella and Marks, 1993).

Tem sido demonstrado que este processo se inicia com a ativação de receptores existentes na membrana plasmática e que, em sua maioria, são formados por sete domínios transmembrana e acoplados a um complexo heterotrimérico de proteínas  $G_q$  ( $\alpha$ ,  $\beta$ , e). No estado inativado, estas proteínas  $G_q$  estão acopladas entre si e ligadas ao difosfato de guanosina (GDP). A ligação da droga ao seu receptor específico, ativa esse complexo proteico, e a subunidade  $G_{\alpha_q}$ , então ativada, liga-se ao trifosfato de guanosina (GTP). O complexo proteína  $G_{\alpha_q}$ -GTP ativa a enzima fosfolipase  $C_{\beta 1}$  (PL  $C_{\beta 1}$ ), a qual é responsável pela hidrólise do lipídio de membrana fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato ( $PIP_2$ ), e a consequente produção de dois segundo mensageiros, o inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) e 1,2-diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  difunde-se rapidamente da superfície da membrana celular até os receptores de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ), localizados na membrana do RS. A interação do  $IP_3$  com o receptor induz neste uma alteração conformacional e a consequente liberação de  $Ca^{2+}$  do RS para o citosol, e produz a contração. O papel tão importante do  $IP_3$  no acoplamento fármaco-mecânico do músculo liso e, provavelmente do músculo cardíaco, contrasta-se com o escasso papel deste segundo mensageiro no acoplamento excitação-contração do músculo esquelético (Bezprozvanny and Ehrlich, 1995; Horowitz et al., 1996; Karaki et al., 1997).

O segundo composto hidrolisado a partir do  $PIP_2$  é o DAG, constituído de dois ácidos graxos e glicerol, composto este que permanece associado à membrana. O DAG ativa uma serina/treonina cinase, a *proteína cinase C* (PKC). Entretanto, a ativação da proteína cinase C necessita também da presença de um sinal de  $Ca^{2+}$  no citoplasma o qual promove o recrutamento da PKC para a membrana e, portanto, sua interação com o DAG. Como a ativação da PKC ocorre logo após a ativação PLC, a formação simultânea de  $IP_3$  e de DAG garante a sincronização destes dois compostos. Em consequência, a PKC fosforila um certo número de substratos, receptores, canais iônicos ou enzimas, levando a uma modificação no estado funcional da célula alvo (Kamoun, Lavoigne e Verneuil, 2006). Especificamente nos miócitos cardíacos, a ação da PKC é a fosforilação de um canal iônico de membrana, seletivo a íons  $Ca^{2+}$ , causando o fluxo transiente destes íons para o citosol cardíaco (Endoh, 1996; Gambassi et al., 1998; DeSantiago et al., 1998)

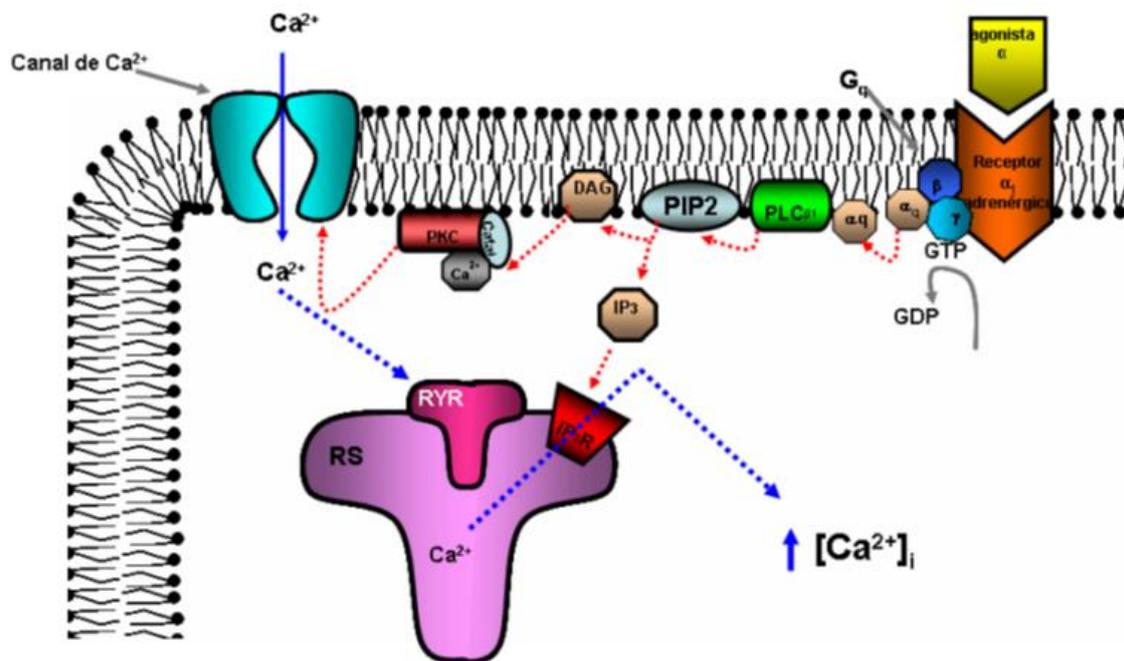


Figura 9 – AEC Via Estimulação  $\alpha$ -Adrenérgica. Desenho esquemático do processo de AEC via  $\alpha$ -adrenérgico identificando a sequência de eventos iniciados pela ligação entre o agonista e o receptor. Tal ligação induz a ativação da proteína Gs e a consequente cascata de eventos mediado pela enzima PLC $\beta$ 1. Na sequência, ocorre a ativação dos canais de cálcio da membrana e do RS resultando, finalmente, na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol (Fonte: Bers, 2002).

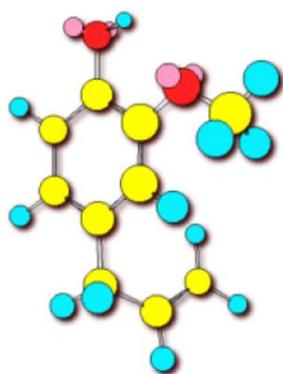
## 5 – Óleos Essenciais – Eugenol

Nativo das ilhas Molucas, o cravo junto com a pimenta do reino, canela e noz-moscada, é uma das especiarias mais conhecidas do mundo (Lavabre, 1997). O eugenol, principal componente do óleo de cravo, apresenta-se como um líquido incolor ou com coloração pálida. Tem fragrância quente, picante, característica; tal qual o cravo. Pouco solúvel em água, miscível com álcool, clorofórmio, ácido acético e óleos. Quimicamente, o eugenol é uma molécula de 2-Metoxi-4-(2-propenil) fenol; 4-alil-2metoxifenol; alilguaiacol; ácido eugênico; ácido cariofílico (Thompson et al., 1989).  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$ ; peso molecular= 164.2;  $d=1.06$ .

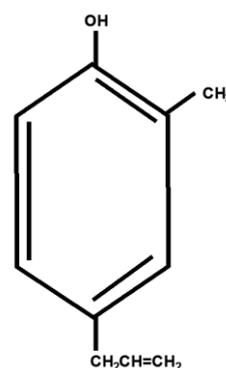
Além de ser o principal componente do óleo de cravo, o eugenol é componente constituinte dos óleos essenciais ou extratos de muitas outras plantas, como a canela e o manjeriço (Thompson et al., 1989; Wrigh et al., 1995). A flora brasileira apresenta uma grande variedade de plantas que guardam o eugenol e/ou seus análogos na composição de seus óleos essenciais. O gênero *croton*, por exemplo, é muito importante na flora nordestina

não somente por sua larga ocorrência e dispersão nos cerrados, matas dos tabuleiros litorâneos, matas pluviais e, nas caatingas nordestinas, mas também pela sua utilidade ao homem do campo (Ducke, 1959).

No entanto, similares sintéticos derivados do petróleo, obtidos por preços menores, forçaram uma diminuição do uso dos óleos essenciais como matéria prima para a indústria internacional (Craveiro et al., 1981). O eugenol, portanto, além de ser encontrado livremente na natureza, também pode ser adquirido comercialmente. Assim, ele é largamente utilizado na medicina popular no preparo de chás e infusados os quais são considerados como benéficos no tratamento de algumas doenças tais como desordens gastrintestinais e diarreia crônica (Leal-Cardoso, 1994; Nishijima et al., 1998; Thompson, 1989).



Estrutura Tridimensional



Estrutura Plana

Figura 10 - Estrutura química da molécula de eugenol.

Na indústria ele é empregado para acentuar o paladar de doces e bebidas, sendo ainda empregado na manufatura de cosméticos (Leal-Cardoso, 1994). Na odontologia, o eugenol é excelente para o alívio da dor induzida por pulpite dentária. É também utilizado na terapia dentária, na forma de pasta zinco-enólica, como material capeador de polpas expostas, como restaurador provisório para cavidades sensíveis e, como material obturador de canais radiculares.

Por ser lipofílico é rapidamente absorvido (Escobar, 2002) e é capaz de atravessar as membranas biológicas e atingir alvos intracelulares como as

mitocôndrias, onde inibe a oxidação do NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida), diminuindo os níveis de ATP (Usta et al, 2002).

Em estudo realizado com o músculo esquelético de sapo, o eugenol (0,1-2,5 mM) bloqueou a contração induzida por 80 mM K<sup>+</sup>, efeito atribuído a uma diminuição na liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares. Em concentrações mais altas (3-12 mM) o eugenol promoveu contração independente do Ca<sup>2+</sup> extracelular e bloqueável pela procaína, sugerindo que o eugenol estaria liberando Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático (Leal-Cardoso, et al., 1994).

Os efeitos biológicos do eugenol dependem de sua concentração e do tempo de exposição ao tecido (Escobar, 2002). Possui várias propriedades farmacológicas, com antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, modulador de respostas imunes, anticarcinogênica, cardiovasculares, antinociceptiva e anestésica local. Podemos destacar também atividade espasmolítica, antisséptica, relaxante muscular (Almeida, 2004), redutor de edema de língua induzido por envenenamento por plantas (Dip et al, 2004), atividade anti-helmíntica em ruminantes (Pessoa et al, 2002).

O eugenol, nas concentrações de 10 a 1000 µM, promoveu vasodilatação da artéria pre-contraída pela norepinefrina, por altas concentrações de K<sup>+</sup> e pela estimulação elétrica, tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro*. Esses efeitos foram atribuídos a um bloqueio de canais de cálcio e ainda inibição da maquinaria contrátil (Hume, 1983; Nishijima et al,1999). O tratamento intravenoso de ratos com eugenol induz uma hipotensão arterial a partir da dose de 1mg/Kg tanto em ratos anestesiados quanto acordados. O eugenol *in vitro* apresentou atividade vasodilatadora em leito mesentérico pre-contraído por 60 mM de K<sup>+</sup> (Lahlou et al,2004).

Sensch et al. (2000) demonstraram que o eugenol exerceu efeitos inotrópicos negativos em músculo cardíaco semelhante ao que se observa quando bloqueamos os canais de cálcio com nifedipina. Tal efeito inotrópico negativo pode ser resultado do bloqueio de canais de cálcio de membrana. Foi sugerido também que a redução da ativação das proteínas contrateis observada na tensão basal pode ser resultado do esgotamento dos reservatórios de Ca<sup>2+</sup> intracelular durante o período de repouso, que pode ser resultado do bloqueio dos canais de Ca<sup>2+</sup> de membrana (Wendt-Gallitelli, 1985).

Em estudos realizados por Damiani et al (2004) foi observado que o eugenol deprime a contratilidade do miocárdio de forma concentração dependente e também reduz o parâmetro de tempo das contrações isométricas. Que o efeito inotrópico negativo do eugenol foi revertido por ISO e  $Ca^{2+}$ , e que este efeito não foi acompanhado por uma redução da potenciação relativa, sugerindo que não há interferência com a atividade do RS. A ação depressora do eugenol sobre a contração, sem interferência com a função do RS reforça a hipótese de redução do influxo de  $Ca^{2+}$ . O efeito depressor do eugenol em contrações tetânicas sugere que sua ação seja supostamente nas proteínas contrateis, porém não foi observado redução da atividade da ATPase de miosina. Como foi observado uma redução no influxo de  $Ca^{2+}$  sugere-se que este óleo atua bloqueando os canais de cálcio de membrana, que parece ser a razão pela qual observados efeito inotrópico negativo.

Em estudos realizados em músculo atrial intacto, Olivoto (2008), observou que os efeitos do eugenol sobre o AEC são concentração-dependentes e, que em altas concentrações, este composto é capaz tanto de abolir o abalo muscular quanto de induzir um aumento da tensão de repouso.

Bloqueadores dos RyRs não foram capazes de alterar o desenvolvimento de tensão de repouso induzida pelo eugenol, indicando que a via pela qual este composto estaria agindo seria independente dos RyRs. Em músculo atrial intacto o bloqueador de  $IP_3Rs$  (2-APB), foi capaz de reduzir a capacidade do eugenol em aumentar a força, de forma parcial, sugerindo que este óleo possa estar atuando, via  $IP_3Rs$  (Olivoto, 2008).

Em fibras permeabilizadas por saponina observou-se que a Heparina, um bloqueador  $IP_3Rs$ , foi capaz de reduzir a capacidade do eugenol em aumentar força. Tal qual observado com 2-APB, o bloqueio foi parcial, indicando que parte da ação do eugenol é por  $IP_3Rs$ , contudo, sugerindo que eugenol poderia também estar agindo através de uma segunda via de ação (Olivoto, 2008).

Também foi observado, em fibras permeabilizadas, que a força induzida por eugenol é um estado ativo de ciclização das pontes cruzadas, uma vez que o BDM foi capaz de revertê-la, e que sua ação não é diretamente nas proteínas contrateis uma vez que sua ação foi revertida quando as preparações foram permeabilizadas por Triton X-100. O mesmo não foi observado em solução com alta concentração de EGTA (quelante de  $Ca^{2+}$ ), nestas condições o eugenol foi

capaz de induzir aumento da força. Desta forma os resultados sugerem que o eugenol seria, provavelmente, um agonista de IP<sub>3</sub>Rs, e assim, induzindo a liberação de Ca<sup>2+</sup> a partir do RS. Entretanto, o eugenol, possuiria ainda, uma segunda via de ação, desconhecida, independente de Ca<sup>2+</sup>, e possivelmente com uma capacidade de ativação das proteínas contráteis superior àquela observada pela via IP<sub>3</sub>Rs (Olivoto, 2008).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho objetiva avaliar os efeitos do eugenol sobre a tensão de repouso de trabéculas de músculo atrial de ratos na ausência de cálcio.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**a)** Avaliar se a ação do eugenol é diretamente sobre o complexo de proteínas contráteis.

**b)** Determinar se o eugenol é capaz de induzir aumento da tensão de repouso em soluções com ausência de cálcio.

**c)** Identificar as possíveis vias de ação do eugenol.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1– Procedimentos Experimentais

Para este estudo foram utilizados 280 ratos machos Wistar com aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 250 - 300g e fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em gaiolas sob condições controle de temperatura e ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e água. Os cuidados e o uso dos animais obedeceram às determinações “Normas de Uso e Manuseio de Animais Experimentais” da Universidade Federal do Paraná e de acordo com as recomendações da Convenção Helsing.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, certificado nº 231, processo 23075.021110/2007-11, aprovado em 29 de junho de 2007. Os experimentos foram realizados de agosto de 2007 a novembro de 2011.

Os ratos foram anestesiados por inalação de éter etílico e exanguinados imediatamente após a anestesia. Os corações foram removidos rapidamente após toracotomia. Após a remoção, os corações foram perfundidos com solução de Ringer através do coto aórtico para permitir a adequada seleção e dissecação dos átrios. O tempo entre a toracotomia, remoção dos corações e dissecação dos átrios não ultrapassou 1 minuto. Após a dissecação dos átrios, trabéculas foram dissecadas para serem utilizadas nos experimentos. As trabéculas foram dissecadas tanto do átrio direito quanto do átrio esquerdo. Foram dissecadas 08 trabéculas de cada par de átrios (Figura 11).

A força desenvolvida ( $F$ ) e/ou a Tensão de Repouso foi avaliada através do uso de um transdutor de força (Scientific Instruments, GMBH, Heidelberg, Alemanha) (Figura 12) e registrados em polígrafo (Beckman 5525; Type RM Dynograph® Recorder). Antes de cada experimento, realizava-se a curva de calibração do transdutor de força obtida com massas conhecidas. Também foi mensurado o comprimento e largura da trabécula (assumindo que as trabéculas eram cilíndricas), com o uso de uma graticula posicionada na ocular do estéreo

microscópio. A área de secção transversa das preparações foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Área} = \text{massa} / (\text{comprimento} \times \text{densidade})$$

Assim, a força produzida pelas trabéculas atriais foi normalizada pela sua área de secção transversa e expressa em  $\text{mN}/\text{mm}^2$ .

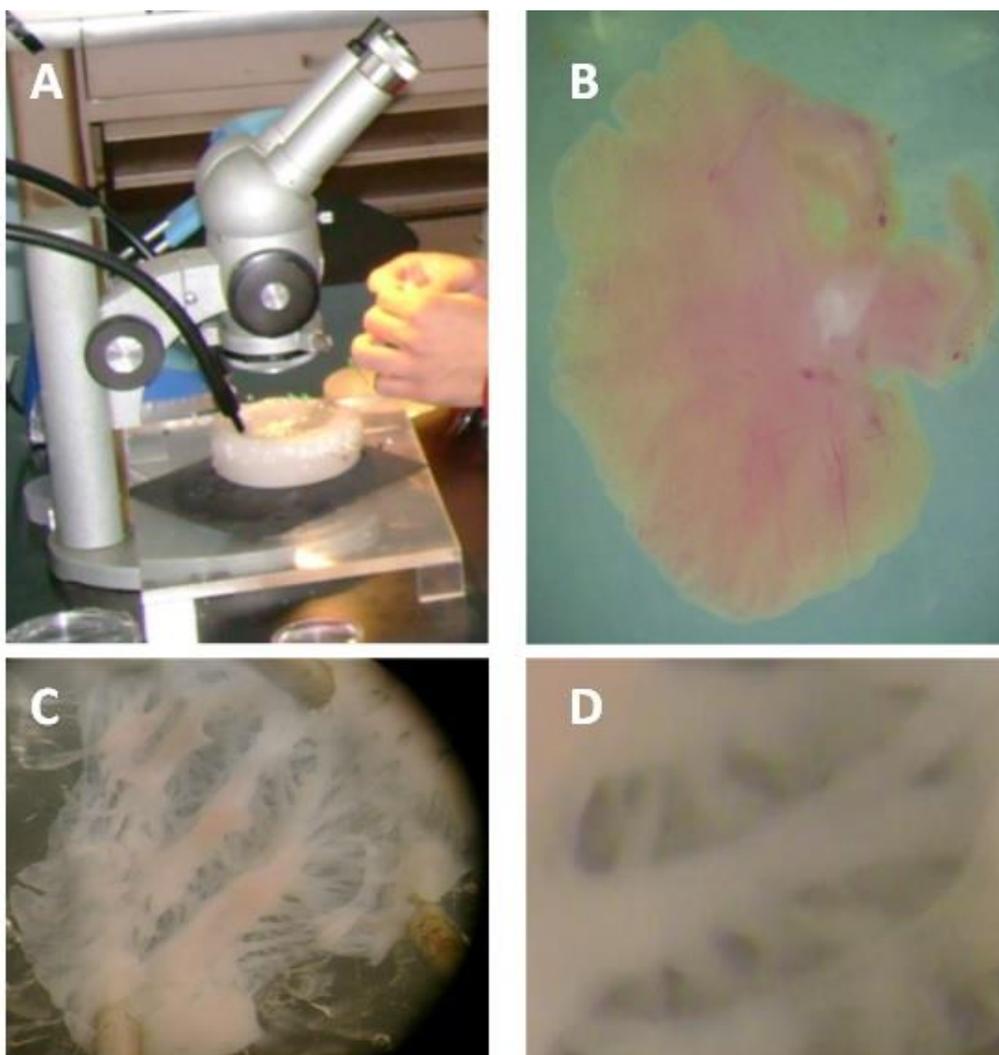


Figura 11 – Fotos dos procedimentos experimentais para dissecação. A – foto do estéreo microscópio da marca Zeiss utilizado para dissecação dos átrios e das trabéculas; B – foto de um átrio após dissecado; C – visão interna de um átrio, permite observar a disposição das trabéculas possibilitando assim identificar as trabéculas a serem dissecadas; D – foto de uma única trabécula que foi dissecada para utilização nos experimentos. Fonte: Olivoto.

## **2 – Procedimentos para Experimentos com Trabéculas Intactas**

Após dissecadas as trabéculas foram montadas em uma cuba com volume de 2,5 ml, e continuamente perfundidos com solução experimental. Para evitar a possibilidade de hipóxia, os experimentos foram realizados sob baixa temperatura ( $28 \pm 1^\circ \text{C}$ ) como previamente descrito (Vassallo et al., 1994) e, continuamente gaseificada com 95% oxigênio ( $\text{O}_2$ ) e 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). As trabéculas foram, montadas e estiradas até um comprimento máximo  $L_{\text{max}}$  (comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima) e estimulados por meio de pulsos retangulares (10 a 15 V; 12 milissegundos de duração) através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo. A frequência de estimulação padrão foi de 0,5 Hz (condição-constante). As preparações foram mantidas por um período de estabilização de 20 minutos para permitir sua adaptação às novas condições ambientais e, em seguida, foram iniciados os protocolos experimentais (Figura 12).

Para os experimentos com trabéculas intactas submetidas a estimulação elétrica indireta utilizamos as seguintes soluções: Solução Ringer Normal, composta por (em mM): 110 NaCl; 4,0 KCl; 2,0  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 2,0  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 10,0 Trisma; 11,0 Glicose; pH 7,4; e Solução Ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ , composta por (em mM): 112 NaCl; 4,0 KCl; 2,0  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 10,0 Trisma; 11,0 Glicose; pH 7,4. Como o eugenol é um óleo e pouco solúvel em água, mantínhamos, tanto a solução estoque quando a solução banho em constante agitação, para garantir sua solubilidade.

### **2.1 – Efeitos do eugenol sobre a tensão de repouso das trabéculas de músculo atrial: Curva Dose-Resposta**

Para se avaliar o efeito do eugenol sobre a tensão de repouso (F) do músculo atrial, foi elaborado o seguinte protocolo: Após período de estabilização de 20 minutos e a preparação mantida sob estimulação padrão, foram adicionadas à solução banho (ringer normal) concentrações cumulativas de eugenol (1, 3, 5, 7 e 10 mM) observando-se um intervalo de tempo de 15 minutos

entre cada concentração. Este período foi suficiente para que a tensão de repouso alcançasse o estado estacionário.

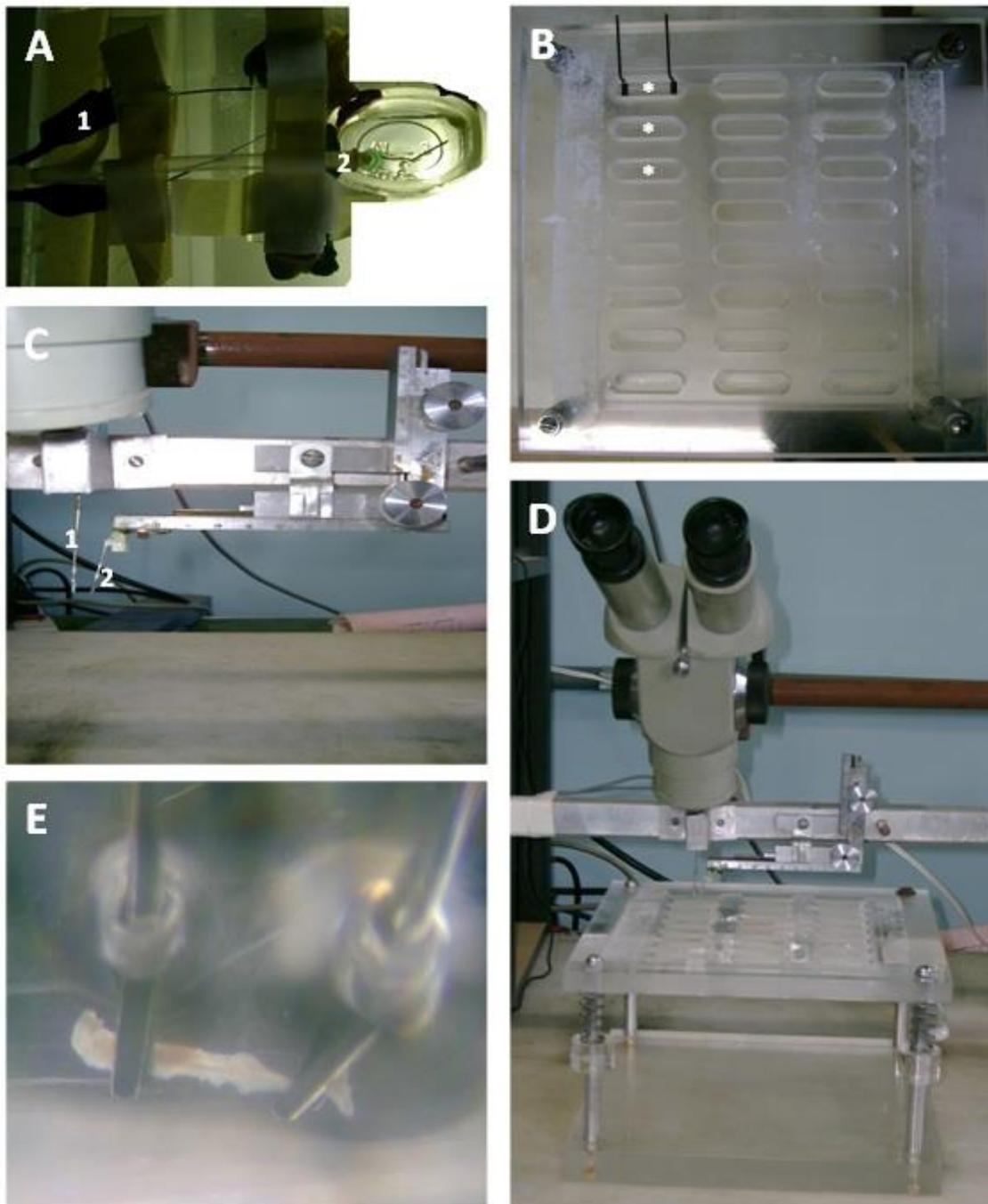


Figura 12 – Fotos dos equipamentos utilizados para realização dos experimentos; A.1 – Sistema de estimulação elétrica indireta; A.2 – sistema de gaseificação; B – foto da plataforma de acrílico contendo as câmaras (\*) onde foram adicionadas as soluções experimentais; C.1 – transdutor de força; C.2 – braço mecânico móvel que permitia o estiramento inicial da preparação; D – foto do sistema completo para realização dos experimentos, contendo estereó microscópio, transdutor de força e plataforma de acrílico; E – trabécula montada entre o transdutor de força e o braço mecânico móvel. Fonte: Olivoto.

## **2.2 – Efeitos do eugenol sobre a mobilização do cálcio intracelular e extracelular, em ringer normal e ringer zero cálcio.**

A liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR) representa um importante estágio no processo de AEC de músculo cardíaco, bem como o controle sobre a contratilidade do coração pode ser exercido através de alterações da concentração extracelular de cálcio  $[Ca^{2+}]_0$  (Yue et al., 1986). A procaína é um anestésico local, capaz de impedir a geração e a condução do impulso nervoso através de sua interação inibitória direta nos canais de sódio voltagem dependentes, bloqueando assim o influxo de íon, da mesma forma é capaz de exercer efeito inibitório sobre os RyRs interferindo no mecanismo de liberação de cálcio do RS (Ostfeld et al., 1997; Rang et al., 2001).

Para determinar se o eugenol estava ou não atuando sobre os principais canais liberadores de  $Ca^{2+}$  do RS (RyRs) (solução Ringer Normal) e/ou se a concentração de cálcio extracelular,  $[Ca^{2+}]_0$ , poderia alterar os resultados (solução Ringer zero- $Ca^{2+}$ ), desenvolvemos um protocolo no qual após estimulação elétrica indireta padrão, o músculo atrial foi tratado, por 10 minutos, com procaína (10 mM). Nos experimentos com Solução Ringer zero- $Ca^{2+}$ , a estimulação elétrica foi realizada em Solução Ringer Normal, após o período de incubação a solução foi substituída por Solução Ringer zero- $Ca^{2+}$ . Após este período de incubação, adicionamos eugenol (5 mM) a solução banho (ringer normal e ringer zero  $Ca^{2+}$ ).

A despeito do fato da procaína poder se mostrado incapaz de inibir o aumento da tensão de repouso induzida pelo eugenol e objetivando nos assegurarmos que o eugenol poderia estar ou não agindo através dos RyRs, desenvolvemos outro protocolo. Elaboramos um protocolo experimental utilizando o bloqueador de RyRs, a rianodina, é um alcaloide encontrado naturalmente no caule e raízes da planta *Ryania Speciosa*. Este composto tem grande afinidade pelos RyRs, com ação inibitória. Os experimentos foram realizados em solução ringer normal e solução ringer zero- $Ca^{2+}$ . Nos experimentos com solução ringer zero- $Ca^{2+}$ , a estimulação elétrica foi realizada em Solução ringer normal, após o período de incubação a solução foi substituída

por solução ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ . Após período de estabilização da preparação sob estimulação elétrica indireta, acrescentamos rianodina (100  $\mu\text{M}$ ) a solução banho, permanecendo assim por 10 minutos. Após o período de incubação foi adicionada, a solução banho, eugenol (5 mM).

Objetivando controlar todas as variáveis que envolvem a liberação de cálcio do RS, elaboramos um protocolo em que utilizamos, em conjunto, dois bloqueadores dos RyRs, procaína (10 mM) e rianodina (100  $\mu\text{M}$ ). O protocolo foi realizado em solução ringer normal e solução ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ . Os procedimentos experimentais iniciais foram os mesmos descritos nos parágrafos anteriores. Após o período de incubação de 10 minutos, foi adicionado, a solução, eugenol (5 mM).

### **2.3 – Efeitos do eugenol sobre as proteínas contráteis**

Para determinarmos se a ação do eugenol poderia ser diretamente nas proteínas contráteis, elaboramos um protocolo utilizando BDM (monóxido de 2,3 butanediona) (30 mM), que atua reduzindo sensivelmente a capacidade máxima de geração de força pelo sistema contrátil por ser capaz de estabilizar o complexo ADP+PI resultando na impossibilidade de ligação de um novo ATP no final do ciclo das pontes cruzadas, (Li et al, 1984; Stephenson & West, 1989; Higuchi & Takemori, 1989).

Após estimulação padrão das trabéculas em solução ringer normal, adicionamos, Procaína (10 mM), para evitar a possível liberação de cálcio do RS, permanecendo nestes condições por 10 minutos. Após este tempo foi adicionado eugenol (5 mM). Após atingirmos o máximo de desenvolvimento de tensão de repouso, adicionamos BDM (30 mM) a solução banho. A preparação foi mantida nestas condições experimentais até que obtivéssemos a estabilização do relaxamento induzido pelo BDM (20 a 30 minutos).

Em um novo protocolo, repetimos os procedimentos experimentais iniciais em solução ringer normal (descritos no parágrafo anterior). Após o período de incubação com procaína (30 mM), a solução banho foi substituída por solução ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ , acrescida de procaína (30 mM) e eugenol (5 mM). Após atingirmos o máximo de desenvolvimento de tensão de repouso, adicionamos

BDM (30 mM) a solução banho. A preparação foi mantida nestas condições experimentais até que obtivéssemos a estabilização do relaxamento induzido pelo BDM (20 a 30 minutos).

Em ambos protocolos, após a ação do BDM, procedemos a lavagem da preparação em solução ringer normal por 5 vezes. Após a lavagem, transferimos a preparação para solução ringer normal eugenol (5 mM).

#### **2.4 – Efeito do Eugenol após o esgotamento dos estoques de Cálcio intracelular por ação da Cafeína**

A possibilidade de esgotamento do  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado no RS foi observada por Bradley et al (2002) em células musculares lisas. O RS foi esgotado de  $\text{Ca}^{2+}$  por ação da cafeína (10 mM) aplicada sequencialmente a intervalos de 1 a 2 minutos. Por outro lado, a cafeína (30 mM) foi utilizada em experimentos com músculos de crustáceos, resultando na ativação dos RyRs e a consequente liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  estocado (Lea, J. T., 1996). A cafeína tem a propriedade de ligar-se ao RyRs de forma efetiva, em outras palavras, enquanto houver cafeína na solução estes receptores permanecem ativados o que possibilita a liberação constante de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (Bradley et al, 2002).

Uma segunda via tem sido proposta como mecanismo que contribui para o CICR cardíaco, o *trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$*  (Bridge et al., 1990). Estes trocadores são responsáveis pelos movimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  através do sarcolema, movimento este acoplado a movimentos recíprocos de  $\text{Na}^+$  (Brenner, 1993).

Elaboramos este protocolo para testar duas hipóteses, a primeira relaciona-se com a possibilidade do eugenol estar atuando de forma cooperativa através destes trocadores; a segunda é se mesmo após o esgotamento do RS por ação da cafeína o eugenol era capaz de aumentar a tensão de repouso. O protocolo foi realizado com trabéculas intactas.

Para realização deste protocolo substituímos a solução ringer normal, pelas soluções ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$  e ringer zero- $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ , ambas acrescida de cafeína (30 mM).

Em solução ringer zero- $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  acrescida de cafeína foi possível inibir a atividade do trocador no sentido direto e indireto, e manter a liberação constante

de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS por ação da cafeína (30 mM), possibilitando então o estabelecimento de um platô na produção de força. Após a obtenção de força máxima em cafeína, observada pela geração de um platô, transferimos a preparação para solução ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ , acrescida de cafeína (30 mM) nestas condições experimentais mantivemos o trocador no sentido indireto inibido, porém permitimos a ativação no sentido direto, facilitando o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para a solução banho. Estes procedimentos foram repetidos de 2 a 5 vezes até que não observássemos mais resposta na presença de cafeína, indicando o esgotamento do RS. Após a preparação foi transferida para solução Ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$  acrescida de cafeína (30 mM) e eugenol (5 mM). Um novo conjunto de trabéculas foi utilizado para determinarmos o eugenol controle.

### **3 – Procedimentos para Experimentos com Trabéculas Permeabilizadas por Saponina e/ou Triton X-100**

Para avaliarmos os possíveis efeitos do eugenol sobre o aparelho contrátil muscular; sobre o retículo sarcoplasmático, bem como sobre a sequência de reações químicas que levam à fosforilação e ativação das proteínas contráteis musculares, realizamos experimentos com a técnica de fibra desmembranada (*skinned fiber*). Esta preparação tem-se mostrado especialmente útil pelo fato de se poder manter sob estrito controle a composição da solução que irá banhar as organelas intracelulares e o sistema contrátil. Com a utilização da solução permeabilizante contendo saponina, 30  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma Chemical), um glicosídeo que atua interagindo com moléculas de colesterol presentes na bicamada lipídica do sarcolema e no sistema tubular transverso, é possível realizar a remoção seletiva desse lipídio de cadeia planar e promovendo perfurações na membrana (Launikonis e Stephenson, 1997). Essas estruturas são seletivamente permeabilizadas preservando, além das proteínas do sistema contrátil, o RS e suas estruturas de membrana. Através deste método foram obtidos os dados referentes ao comportamento do cálcio através da membrana permeabilizada desta organela. Para o estudo dos efeitos do eugenol na ação do cálcio exclusivamente sobre o aparato contrátil actina-miosina, foram utilizada solução permeabilizante purificada contendo Triton X-100 (Boeringer) 1% vol/vol. O Triton X-100 é um detergente não iônico com a capacidade de solubilizar

estruturas lipídicas, como o sarcolema e as membranas de todas as organelas intracelulares, permanecendo intacto e preservado no meio intracelular, apenas o aparelho contrátil (Godt et al., 1991; Lamb et al., 1994).

Os músculos atriais foram preparados conforme descrito anteriormente. Uma vez dissecados, os átrios foram transferidos para uma placa de *Petri* contendo a Solução R (Tabela 1), nesta solução realizamos a dissecação das trabéculas. Em seguida, as trabéculas foram transferidas e mantidas, por 20 minutos, em uma câmara contendo a mesma Solução R acrescida de saponina (30 µg/mL) ou, por 10 minutos, para a Solução R acrescida com 1% (v/v) de Triton X-100, um detergente não iônico. Após a permeabilização por saponina ou por Triton X-100, as trabéculas foram transferidas para outra câmara contendo Solução R e aí mantidas até o início dos experimentos.

Para se realizar o cálculo da composição das soluções foi empregado o programa de computador em linguagem turbo que descreve as múltiplas constantes de equilíbrio de íons em solução usando valores constantes de associação previamente publicados (Godt & Lindley, 1982; Andrews et al., 1991). As composições das soluções são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Composição das soluções usadas nos experimentos com fibras permeabilizadas por Saponina e por Triton X-100.

	<b>Solução R</b>	<b>Solução L</b>	<b>Solução E</b>	<b>Solução A</b>
Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	1	1	1	0,1
MgATP (mmol/L)	1	1	1	1
NaCP (mmol/L)	15	15	15	15
EGTA (mmol/L)	5	5	0,5	5
BES	50	50	50	50
pCa (-log[Ca <sup>2+</sup> ])	>8,5	6,4	>8,5	4,0
pH	7	7	7	7
Força iônica	200	200	200	200
Temperatura (°C)	22	22	22	22

Nota: NaCP, Na<sub>2</sub>phosphocreatine; BES, N,N-Bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid; pCa = -log[Ca<sup>2+</sup>]<sub>0</sub>; e pH = -log [H<sup>+</sup>].

As soluções descritas na tabela 1 tem concentrações de 0,5 mM e 5 mM de EGTA (ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) que é um agente com capacidade de quelar íons Ca<sup>2+</sup> da solução (Godt & Lindley, 1982; Andrews et al., 1991).

A solução R (pCa 8,5) (pCa = -log[Ca<sup>2+</sup>]) é denominada de solução relaxante por apresentar uma concentração de íons Ca<sup>2+</sup> inferior a 10<sup>-8,5</sup> M e alta

concentração de EGTA, o que permite quelar todo o  $\text{Ca}^{2+}$  que ainda possa estar na solução banho. É descrito na literatura que a cafeína, um conhecido agonista de RyRs, na concentração de 30 mM, é capaz de induzir a liberação total dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (Endo, 1975).

A Solução A (pCa 4.0) possui concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  suficiente para a ativação máxima do aparato contrátil fornecendo, conseqüentemente a máxima capacidade de desenvolvimento de força pela trabécula. Para efeito de quantificação, a força desenvolvida pela trabécula quando em pCa 4,0 foi determinada como padrão máximo de produção de força.

A solução L (pCa 6,4) apresenta uma concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  suficiente para induzir, por transporte ativo, a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o RS. Dessa forma, podemos afirmar que a solução L apresenta a propriedade de recarregar com íons  $\text{Ca}^{2+}$  o RS. Portanto, é possível, nestas condições experimentais, submetermos as mesmas trabéculas a soluções diferentes, com agentes diferentes, possibilitando assim, uma análise comparativa direta entre os vários tratamentos.

A solução E (pCa 8,5) apresenta uma concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  inferior a  $10^{-8}\text{M}$ . Como a concentração de EGTA é baixa (0,5 mM), sua capacidade de tamponamento de íons  $\text{Ca}^{2+}$  é pequena. Portanto quando a liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS é efetuada, este íon (por não ser tamponado) ativará o sistema contrátil, o qual desenvolverá tensão, e esta fornecerá um indicativo da quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado do RS.

Como o eugenol é um óleo e pouco solúvel em água, a solução estoque foi vigorosamente agitada antes de ser adicionada a solução banho, para garantir sua solubilidade.

### **3.1 – Efeitos do eugenol sobre produção de força em trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e Triton X-100**

Para testarmos os efeitos do eugenol sobre os estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  bem como, sobre o aparato contrátil, desenvolvemos o seguinte protocolo: Após serem montadas entre um transdutor de força e um braço móvel, as trabéculas foram estiradas 20% em relação ao seu tamanho na condição de relaxamento, e mantidas, por poucos minutos, em solução R.

A partir da solução R, as trabéculas foram transferidas para a solução A, onde permaneceram tempo suficiente para a determinação da força máxima induzida pela alta concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na solução. Tal tempo foi suficiente para ativar todo o aparato contrátil.

Após, as trabéculas foram novamente transferidas para Solução R relaxante e mantidas nesta por alguns minutos. Esses minutos constituirão tempo suficiente para o relaxamento total da preparação em decorrência da ação do EGTA.

Em seguida, a trabécula foi transferida, por um período de 2 minutos, para Solução L. Isto possibilitou que o RS fosse recarregado com íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Dados de nosso laboratório indicam que esse tempo é suficiente para a obtenção da capacidade máxima de carregamento do RS (dados não mostrados).

Em seguida, as trabéculas foram transferidas e mantidas, por 30 segundos, em Solução E. Da solução E, a preparação foi transferida para outra câmara contendo Solução E acrescida de Cafeína (30 mM). A preparação foi mantida nesta condição pelo tempo suficiente para ativação do aparato contrátil e produção de força em decorrência dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  liberados do RS por ação da Cafeína.

Em seguida, a preparação foi transferida para a Solução R, a fim de que os íons  $\text{Ca}^{2+}$  liberados por ação da cafeína sejam quelados e, conseqüentemente, ocorra o relaxamento muscular. Uma vez atingido o estado de relaxamento, a preparação foi transferida para a Solução E. Logo após, a preparação, foi transferida para uma nova câmara contendo Solução R acrescida de Eugenol (5 mM). A preparação foi mantida nesta câmara até que a tensão de repouso atinja um platô de estabilização. Após, foi adicionado à solução Triton X-100 1%.

### **3.2 – Efeitos do Vermelho de rutênio (RR) sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina**

Desenvolvemos um protocolo no qual a preparação, foi submetida a um tratamento com vermelho de rutênio (10  $\mu\text{M}$ ). O vermelho de rutênio (Ammoniated Ruthenium Oxycloiride) é um agente bem descrito na literatura e utilizado como inibidor do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Gunter, 1990) bem

como um inibidor de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS de músculo liso, músculo estriado e cardíaco (Vites e Pappano, 1994; Chamberlain et al., 1984). As trabéculas atriais foram preparadas e montadas conforme o descrito anteriormente, só que desta feita, após passarem pelas câmaras contendo solução A e pelo câmaras contendo solução R, as trabéculas foram transferidas, e incubadas por 20 minutos, num câmaras contendo Solução E acrescida de vermelho de rutênio ( $10 \mu\text{M}$ )

Logo após, a preparação, foi transferida para uma nova câmara contendo Solução R contendo vermelho de rutênio ( $10 \mu\text{M}$ ) e eugenol (5 mM). A preparação foi mantida nestas condições até que a tensão de repouso atingisse um platô de estabilização.

### **3.3 – Efeitos do BDM sobre a ação do eugenol no processo de AEC de fibras permeabilizadas por saponina**

Elaboramos um protocolo no qual utilizamos o BDM (monóxido de 2,3 butanediona) um bem descrito bloqueador do ciclo das pontes transversas (Li et al., 1984; Stephenson & West, 1989; Higuchi & Takemori, 1989 Herrmann et al., 1992). As trabéculas atriais foram preparadas e montadas conforme o descrito anteriormente. Após a obtenção da força máxima em solução A, e o relaxamento total em solução R, transferimos as trabéculas para uma câmara contendo Solução R e Eugenol (5 mM). Após o desenvolvimento da máxima tensão de repouso induzida pela ação do eugenol, transferimos a trabécula para uma câmara contendo solução R acrescida de eugenol (5 mM) e BDM (10 mM). A preparação foi mantida nessas condições até que fosse atingida a estabilização.

Posteriormente, o mesmo protocolo foi repetido, porém, na presença de BDM (30 mM).

Após atingida a estabilização nesta fase experimental, as trabéculas foram lavadas por 5 vezes, e submetidas a solução R acrescida de eugenol (5 mM) para obtenção dos dados de eugenol controle.

### **3.4 – Relação entre diferentes concentrações de íons Cálcio na solução banho e a Tensão de Repouso induzida pelo Eugenol**

A técnica de fibras permeabilizadas permite que possamos utilizar soluções com controle rígido da composição e concentração, desta forma, realizamos um protocolo em que utilizamos concentrações diferentes de  $\text{Ca}^{2+}$  em solução, iniciando em  $10^{-8,5}$  e finalizando em  $10^{-4,0}$ . O objetivo deste protocolo foi determinar se o eugenol atua diretamente na maquinaria contrátil, ou atua sensibilizando as proteínas contrateis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , ou então se atua promovendo a extração de Troponina I.

Para os experimentos utilizamos trabéculas atriais permeabilizadas por Triton X-100 1% (Vol/Vol), desta forma mantivemos todas as proteínas celulares intactas dentre elas as proteínas contrateis. O protocolo foi realizado na presença e ausência de eugenol (5 mM).

### **3.5 – Efeitos do eugenol sobre o processo de AEC antes e depois das fibras atriais serem permeabilizadas com Triton X-100**

A técnica de permeabilização permite que utilizemos soluções que banharam diretamente as organelas celulares. Por este motivo elaboramos um protocolo em que submetemos as trabéculas a permeabilização por duas técnicas, ou seja, a mesma trabécula foi permeabilizada por saponina e por Triton X-100.

O Triton X-100, como já descrito é capaz de solubilizar estruturas lipídicas tanto de membrana plasmática quanto de membrana de organelas intracelulares. O EGTA, também já descrito, atua quelando o  $\text{Ca}^{2+}$  livre celular. Desta elaboramos este protocolo para responder as seguintes questões: a) o EGTA é capaz de quelar o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado do RS por ação da cafeína; b) mesmo em alta concentração de EGTA o eugenol é capaz de induzir o aumento da tensão de repouso; c) após a trabéculas ser permeabilizada por Triton X-100 o eugenol ainda é capaz de induzir aumento de tensão de repouso; e d) a permeabilização por Triton X-100 pode, de alguma forma, alterar a capacidade das proteínas contrateis em desenvolver força na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Desta forma os procedimentos experimentais foram os seguintes: as trabéculas foram permeabilizadas por saponina (30  $\mu\text{g/mL}$  – 20 minutos), após a permeabilização obtivemos a força máxima em solução A, após o relaxamento em solução R, foram transferidas para solução L, para carregamento, preparadas em solução E e em seguida transferidas para solução R (alto EGTA) acrescido de cafeína (30 mM). Transferidas então para solução R acrescida de eugenol (5 mM), após estabilização nesta solução, transferidas para solução R acrescida de Triton X-100 (1% - Vol/Vol – por 10 minutos). Após a permeabilização com Triton, foram transferidas para solução R acrescida de eugenol (5 mM). Para finalizar o protocolo, transferimos a trabécula para solução A, e mantidas nestas condições até que atingisse o platô de estabilização.

### **3.6 – Efeitos do tempo de exposição a saponina sobre a capacidade de produção de força induzida por Cálcio e Cafeína e elevação da Tensão de Repouso induzida pelo Eugenol**

Elaboramos um protocolo em que as trabéculas foram permeabilizadas em tempos diferentes, sendo eles: trabéculas intactas (tempo zero), trabéculas permeabilizadas (tempo 20, 40, 60 e 80 minutos) por saponina. O objetivo deste protocolo foi determinar se era necessária a permeabilização para obtermos resposta em solução A; se a permeabilização por saponina resultava em alguma alteração na resposta a cafeína, ou seja, se a saponina poderia estar atuando sobre as organelas celulares; e determinarmos se o aumento da tensão de repouso induzida por eugenol sofria alteração ao longo do tempo de permeabilização.

As trabéculas foram expostas a solução A, para determinar a integridade das proteínas contrateis; solução E acrescida de cafeína (30 mM) para determinar a integridade do RS; e solução R acrescida de eugenol (5 mM) para determinar a capacidade do eugenol em aumentar a tensão de repouso ao longo do tempo de exposição a saponina.

### **3.7 – Efeitos do 1,4-Ditiotreitol (DTT) sobre a ação do Eugenol**

Elaboramos um protocolo utilizando o 1,4-Ditiotreitol (DTT) (100  $\mu$ M), um agente redutor, que é capaz de proteger proteínas, em solução, da degradação e não é capaz de induzir a produção de força (Posterino & Lamb, 1996). O DTT foi adicionado à solução R durante a permeabilização (20 minutos). Para os experimentos utilizamos Solução R acrescida de DTT, para determinarmos se este composto era capaz de ativar a maquinaria contrátil ou capaz de induzir a produção de força de alguma outra forma; e Solução R acrescida de Eugenol, para determinarmos se a ação do DTT poderia de alguma forma alterar a capacidade do eugenol (5 mM) em induzir aumento da tensão de repouso. Um novo conjunto de trabéculas, permeabilizadas por saponina (20 minutos), foi utilizado para determinarmos o eugenol controle.

### **3.8 – Efeitos da Colchicina (colch) sobre a ação do Eugenol**

Para complementar o protocolo anterior, realizamos um conjunto de experimentos utilizando Colchicina (30  $\mu$ M). A colchicina é um agente desorganizador dos microtúbulos. Os microtúbulos são estruturalmente o suporte para fixação e tráfego de proteínas e enzimas citoplasmáticas. O objetivo deste protocolo foi determinar se a possível via pela qual atua o eugenol está associada aos microtúbulos. Desta forma, se o agente pelo qual atua o eugenol for uma proteína associada ao microtúbulo (MAP), a desorganização possivelmente potencializará a ação do eugenol. Com a desorganização do microtúbulo a concentração do possível agente pelo qual o eugenol atua aumentaria significativamente resultando na potencialização da ação deste óleo essencial, mesmo na presença de alta concentração de EGTA. Após o período de permeabilização por saponina, as trabéculas foram transferidas para solução A, para determinação da força máxima. Em seguida relaxadas em solução R, após passaram por solução L para carregamento do RS, e em seguida transferidas para solução E acrescida de cafeína (30 mM). Após foram transferidas para solução R acrescida de colchicina (30  $\mu$ M), onde permaneceram por 20 minutos. Após o período de encubação foram transferidas para solução R acrescida de eugenol (5 mM) e colchicina (30  $\mu$ M). Um novo

conjunto de trabéculas, permeabilizadas por saponina (20 minutos), foi utilizado para determinarmos o eugenol controle.

### **3.9 – Experimentos com o produto da permeabilização das trabéculas e seu efeito sobre o Eugenol**

Em complemento aos protocolos anteriores resolvemos testar a viabilidade da reincorporação, do produto da permeabilização das trabéculas no tempo de 80 minutos, em trabéculas permeabilizadas por Triton X-100. Para os experimentos produzimos duas soluções experimentais denominadas de “SUCO” e “SUCO+COLCH”. Permeabilizamos aproximadamente 60 mg de tecido atrial, por 80 minutos com saponina em solução R, o produto desta permeabilização, ou seja, o que foi perdido do tecido para a solução banho, foi denominado de SUCO. A mesma quantidade de tecido atrial, ou seja, 60 mg, foi permeabilizada por 80 minutos com saponina acrescida de colchicina (30  $\mu$ M) em solução R, o produto desta permeabilização foi denominado de SUCO+COLCH.

As trabéculas utilizadas para os experimentos foram permeabilizadas por Triton X-100 1% (vol/vol) por 10 minutos. Este protocolo foi elaborado para testar as seguintes hipóteses: após a permeabilização por Triton X-100 não observamos mais a resposta em cafeína em razão da solubilização da membrana do RS; após permeabilização por Triton X-100 o eugenol perde a capacidade de induzir aumento de tensão de repouso; a via pela qual atua o eugenol é citosólica e solúvel em 80 minutos de permeabilização por saponina; e a permeabilização por saponina na presença de colchicina potencializa os efeitos do eugenol.

Os procedimentos experimentais foram os seguintes: solução A para obtenção da força máxima e determinação da integridade da maquinaria contrátil; transferência, após carregamento em solução L, para solução E acrescida de cafeína (30 mM) para determinarmos se o RS foi solubilizado por ação do Triton X-100; transferência para solução R acrescida de eugenol (5 mM) para determinarmos se este óleo atua diretamente na maquinaria contrátil; transferência para câmara contendo SUCO, permanecendo nesta condição até estabilização, e em seguida transferida para solução SUCO acrescida de

eugenol (5 mM). Um novo conjunto de trabéculas, também permeabilizadas por Triton X-100, foram submetidas as etapas iniciais descritas acima. Após passarem por solução R acrescida de eugenol (5 mM), foram transferidas para solução SUCO+COLCH, permanecendo nesta condição até estabilização, em seguida foram transferidas para solução SUCO+COLCH acrescida de eugenol (5 mM). Um novo conjunto de trabéculas, permeabilizadas por saponina (20 minutos), foi utilizado para determinarmos o eugenol controle.

#### **4 – Possíveis vias de ação do Eugenol**

##### **4.1 – Possível envolvimento da via p38 MAPk**

Em estudos realizados por Vahebi et al (2006) foi observado que a ativação aguda da p38 MAPk resulta numa diminuição da capacidade de desenvolver tensão/força em miócitos cardíacos. Para testarmos esta hipótese utilizamos em nossos experimentos o arsenito de sódio, que é agente agonista da p38 MAPk.

##### **a) Curva dose resposta ao arsenito de sódio**

Para determinarmos a concentração ideal do arsenito de sódio para nossos experimentos realizamos um curva dose resposta em trabéculas intactas. As trabéculas foram submetidas a estimulação elétrica indireta (como descrito no tópico 2 deste capítulo), após período de estabilização, adicionamos a solução ringer normal eugenol (5 mM), após o desenvolvimento da tensão de repouso máxima, adicionamos, de forma cumulativa, arsenito de sódio nas concentrações de 1, 3, 5, 7 e 10 mM. Este protocolo nos possibilita determinar a concentração média de arsenito de sódio a ser utilizada nos demais protocolos.

##### **b) Recuperação após exposição ao arsenito de sódio**

Como o arsenito de sódio é um agente tóxico e poderia de alguma forma alterar a atividade das proteínas contráteis, elaboramos um protocolo para testar a viabilidade das trabéculas após exposição a este agente.

As trabéculas foram estimuladas eletricamente, após a estabilização da preparação nestes condições experimentais, foi adicionado à solução banho (ringer normal) arsenito de sódio (7 mM). Após estabilização, a preparação foi lavada por 5 vezes, e novamente submetida a estimulação elétrica em solução ringer normal, para então determinarmos se a existia ação deletéria do arsenito na preparação. Após a estabilização em condição de estimulação elétrica padrão, foi adicionado à solução banho eugenol (5 mM), para determinarmos se mesmo após a exposição da preparação ao arsenito o eugenol ainda era capaz de aumentar a tensão de repouso.

### **c) Efeitos do arsenito em trabéculas permeabilizadas por saponina**

Para determinarmos se o arsenito era capaz de desenvolver força ou alterar a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, elaboramos um protocolo com fibras permeabilizadas por saponina. Após permeabilização, as preparações foram transferidas para solução A para obtenção da força máxima, após a estabilização nestas condições experimentais, as trabéculas foram transferidas para solução R acrescida de arsenito (7 mM) permanecendo nestas condições por 20 minutos, após o período de encubação, a preparação foi transferida para solução A acrescida de arsenito (7 mM), após estabilização, foi transferida para solução R, e logo em seguida, após o relaxamento total, transferida para solução R acrescida de eugenol (5 mM) e arsenito (7 mM), após estabilização, foi transferida para lavagem em solução R, e em seguida transferida para solução R acrescida apenas com eugenol (5 mM), para determinarmos o eugenol controle.

### **d) Efeitos do arsenito em trabéculas permeabilizadas por Triton X-**

Elaboramos um novo experimento, utilizando desta vez trabéculas permeabilizadas com Triton X-100, que possibilitaria determinar a ação destes agentes diretamente nas proteínas contrateis. Para realização deste protocolo produzimos novamente a solução experimental denominada de SUCO (descrito no item 3.9), que é o produto da permeabilização de trabéculas por saponina no tempo de 80 minutos em solução R. Em específico neste protocolo experimental utilizamos as seguintes soluções experimentais: solução A, solução A acrescida de arsenito de sódio (7 mM), SUCO acrescido de eugenol (5 mM) e SUCO acrescido de eugenol (5 mM) e arsenito de sódio (7 mM). As trabéculas após serem permeabilizadas por Triton X-100 por 10 minutos, foram transferidas para solução A, para obtenção da força máxima, após foram transferidas para solução A acrescida de arsenito de sódio (7 mM), para determinar se este composto altera a sensibilidade das proteínas contrateis ao  $Ca^{2+}$ . Após a preparação foi lavada em solução R, e em seguida transferida para solução SUCO acrescida de eugenol (5 mM), após o desenvolvimento de tensão de repouso máxima, transferimos a trabécula para solução SUCO acrescida de eugenol (5 mM) e de arsenito de sódio (7 mM). Um novo conjunto de trabéculas, permeabilizadas por saponina (20 minutos), foi utilizado para determinarmos o eugenol controle.

#### **4.2 – Redução da concentração de ATP intracelular por ação do eugenol**

Estudos realizado por Jeng et al (1994) demonstram que o eugenol é um agente biológico capaz de reduzir a concentração de ATP livre intracelular, sendo assim, elaboramos um ensaio experimental para determinar se o eugenol é capaz de reduzir a concentração circulante de ATP. Os átrios foram dissecados em solução ringer normal, um dos átrios foi transferido para um eppendorf contendo a mesma solução ringer normal, enquanto que o outro átrio foi transferido para um eppendorf contendo solução ringer normal acrescido de eugenol (5 mM). As preparações permaneceram nestas soluções nos seguintes tempos: tempo zero (zero minutos), tempo 30 (30 minutos) e tempo 60 (60 minutos). Após este tempo, as preparações foram congeladas em nitrogênio líquido, macerados e o pesados. Após o tecido macerado foi suspenso em 1000

ml de ácido perclorato (0,4M) e homogeneizado, centrifugado por 5 min a 3000 rpm, com temperatura constante de 4°C. O sobrenadante foi utilizado para as medições de ATP, utilizando a enzima luciferase. Para determinar a atividade da luciferase, foi pipetado 20 µl de cada amostra, em duplicata, em um tubo Falcon e lidas num luminômetro (GloMax - Promega, Fitchburg, WI, EUA) utilizando Promega Luciferase Assay Substrate. As concentrações de proteína nas amostras foram determinadas usando um ensaio BioRad (Hercules, CA, EUA). Os dados foram normalizados pela concentração de proteína.

## **5 – Drogas**

Todos os sais e substâncias utilizados nesta pesquisa foram de pureza analítica (pureza do eugenol = 99%) e adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo; U.S.A.); Merck (Darmstadt, Alemanha) ou Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Eugenol, procaína, monóxido de 2,3 butanediona (BDM), vermelho de rutênio, 1,4-Ditiotreitol (DTT), colchicina e saponina foram solubilizados em água deionizada e mantidos em baixa temperatura (solução estoque), antes de serem utilizados nos experimentos, foram mantidos em temperatura ambiente e constantemente agitados em agitador magnético. O arsenito de sódio foi solubilizado em solução contendo 90% de água deionizada e 10% de metanol e mantido (solução estoque) em -20°. A rianodina foi solubilizada em metanol 100% e mantida (solução estoque) a -20°. A cafeína foi pesada antes dos experimentos e adicionada diretamente na solução experimental em recipiente de vidro e agitada em agitador magnético até que solubilizasse totalmente, após a solubilização o volume foi transferido para câmara de experimentos. O Triton X-100 foi adicionado diretamente a solução experimental.

## **6 – Análise Estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos 6 observações (n). Para a análise estatística utilizamos o teste t de Student e/ou ANOVA (uma ou duas vias). Quando ANOVA revelou uma diferença significativa o teste de Tukey foi aplicado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas, quando a probabilidade de

ocorrência da hipótese nula foi  $\leq 0,05$ . Valores de \*  $p < 0,05$  e de #  $p < 0,01$  foram considerados significativos. A análise dos dados e a plotagem das figuras foram realizadas utilizando-se os softwares GraphPad Prism System (San Diego, CA, U.S.A.) e/ou SigmaPlot e SigmaStat.

## RESULTADOS

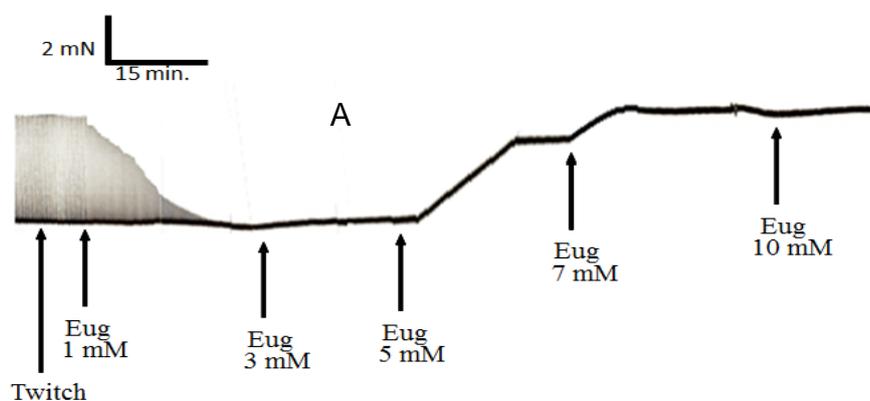
### 1 – Experimentos com Estimulação Elétrica Indireta: trabéculas de músculo atrial intacto

#### 1.1 – Efeitos do Eugenol no processo AEC: curva dose-resposta

Os registros típicos mostram que o eugenol, em diferentes concentrações (1; 3; 5; 7 e 10 mM) foi capaz induzir o aumento da tensão de repouso de forma concentração-dependente. A partir destes dados foi possível determinar o valor médio da produção de forma, ou seja, LogEC50 de 4,781. Os resultados demonstram que o eugenol atingiu tensão de repouso máxima na concentração de 7 mM e, que em 10 mM houve uma estabilização.

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>1 mM</b>	0,000±0,000	6
<b>3 mM</b>	2,963±0,735	6
<b>5 mM</b>	7,318±0,528	6
<b>7 mM</b>	10,862±1,812	6
<b>10 mM</b>	8,828±1,289	6

Tabela 2 – Efeitos do eugenol em diferentes concentrações, curva dose resposta. Os resultados são apresentados como média ± EPM.



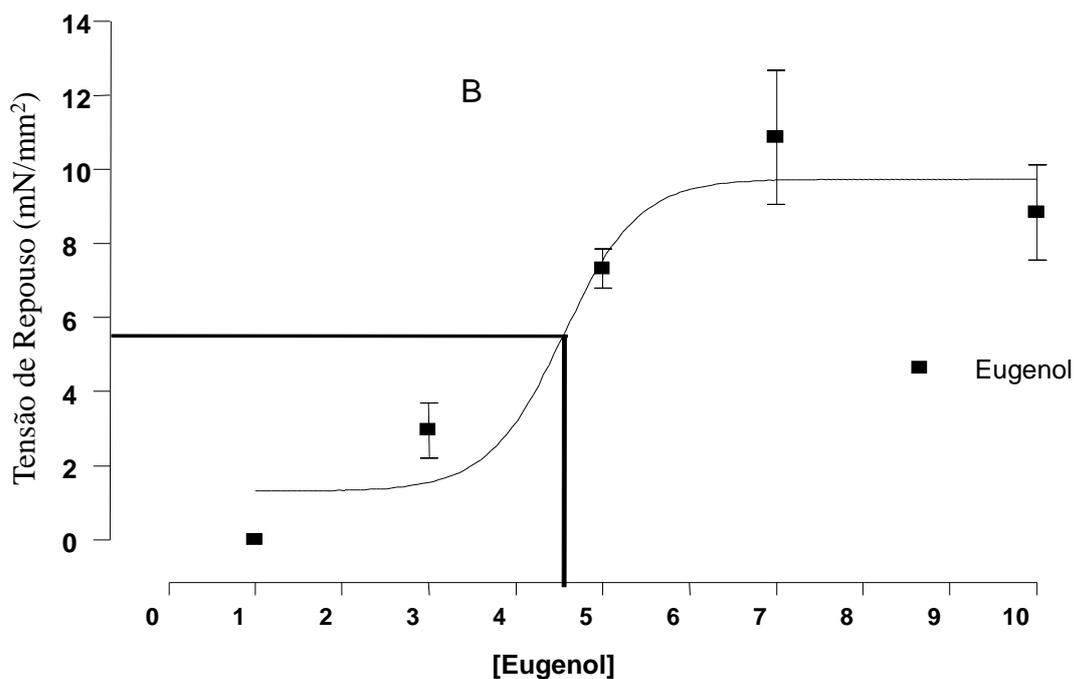


Figura 13 - (A): Registro típico dos efeitos do eugenol, dose-resposta, sobre a tensão de repouso desenvolvida pelas trabéculas de músculo atrial de ratos. (B): Efeitos do eugenol, em diferentes concentrações, sobre a tensão de repouso desenvolvida pelas trabéculas de músculo atrial. Os dados são apresentados como média EPM.

## 1.2 – Efeitos da Procaína sobre a ação do Eugenol em solução ringer normal

Os resultados demonstram, que em solução Ringer Normal a procaína (10 mM) foi capaz de abolir as contrações (abalo), porém, quando o eugenol (5 mM) foi adicionado à solução banho, este composto foi capaz de aumentar a tensão de repouso, estatisticamente igual ao eugenol controle (5 mM).

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>Abalo</b>	7,989±1,035	6
<b>Procaína</b>	0,000±0,000	6
<b>Eugenol + Procaína</b>	7,698±0,933	6
<b>Eugenol Controle</b>	7,318±0,529	6

Tabela 3 – Trabéculas tratadas com procaína. Experimentos em ringer normal. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

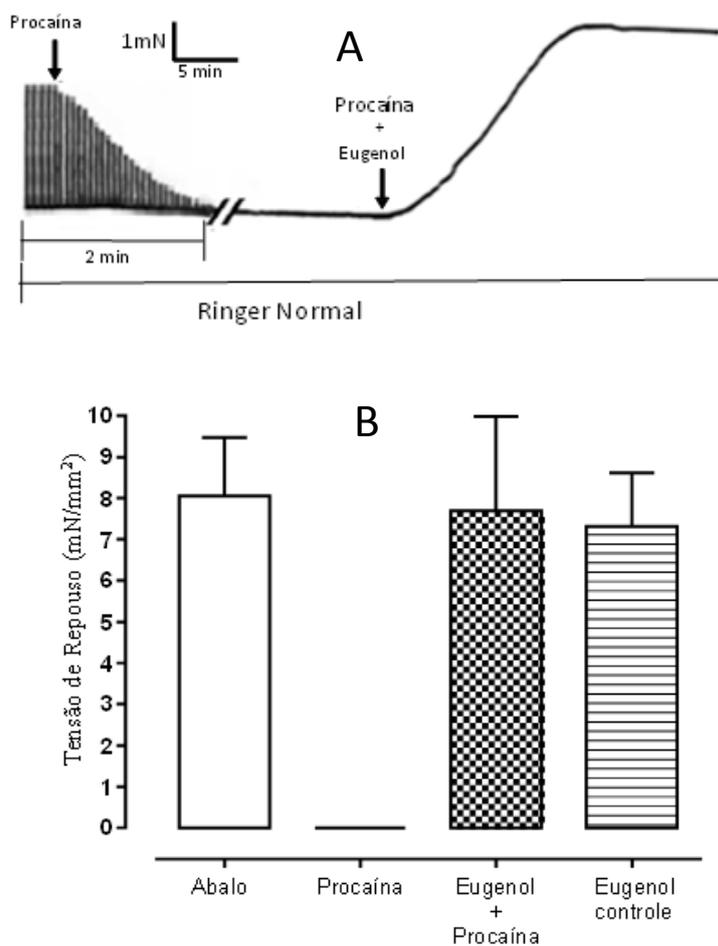


Figura 14 – Efeitos do eugenol após tratamento com procaína sobre a tensão de repouso desenvolvida pelas trabéculas de músculos atriais de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer Normal. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

### 1.3 – Efeitos da Procaína sobre a ação do eugenol em solução ringer zero-Ca<sup>2+</sup>

Os resultados demonstram, que em solução ringer zero-Ca<sup>2+</sup> o eugenol (5 mM) foi capaz de aumentar a tensão de repouso mesmo na presença de procaína (10 mM), estatisticamente igual ao eugenol controle (5 mM).

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>Abalo</b>	8,010 $\pm$ 1,281	6
<b>Procaína</b>	0,000 $\pm$ 0,000	6
<b>Eugenol + Procaína</b>	6,955 $\pm$ 1,148	6
<b>Eugenol Controle</b>	7,164 $\pm$ 1,075	6

Tabela 4 – Trabéculas tratadas com procaína. Experimentos em ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

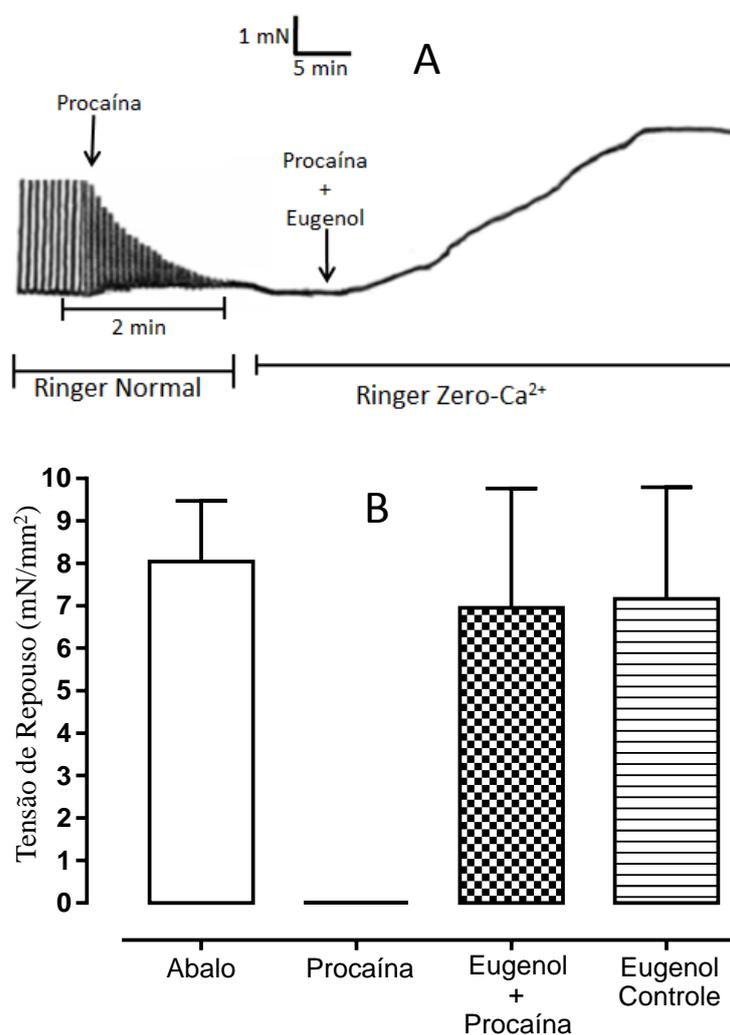


Figura 15 – Efeitos do eugenol após tratamento com procaína sobre tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

#### 1.4 – Efeitos da Rianodina sobre a ação do Eugenol em solução Ringer Normal

Os resultados demonstram que a rianodina (100 µM) foi capaz de abolir a contração (abalo) induzida por estimulação elétrica. Mesma na presença de rianodina o eugenol (5 mM) foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso estatisticamente igual ao eugenol controle (5 mM).

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>Abalo</b>	8,080±1,109	6
<b>Rianodina</b>	0,000±0,000	6
<b>Eugenol + Rianodina</b>	7,329±1,436	6
<b>Eugenol Controle</b>	7,318±0,529	6

Tabela 5 – Trabéculas tratadas com rianodina. Experimentos em ringer normal. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

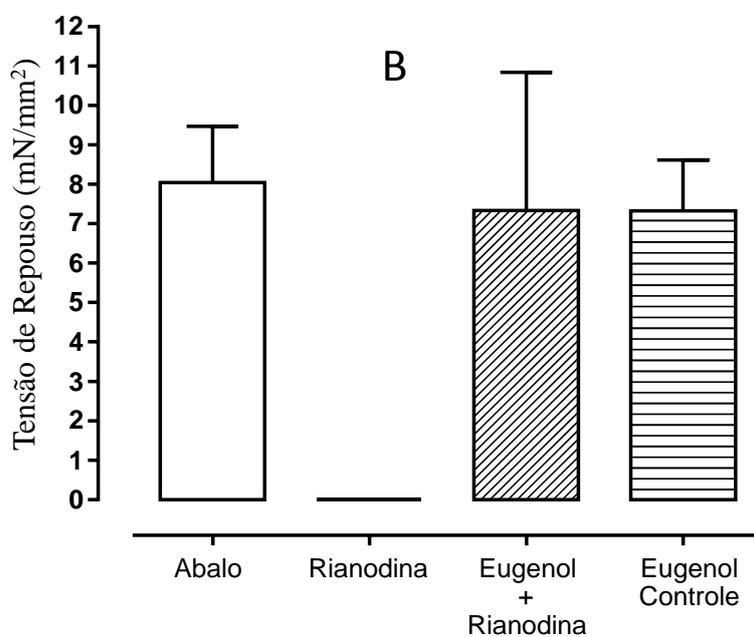
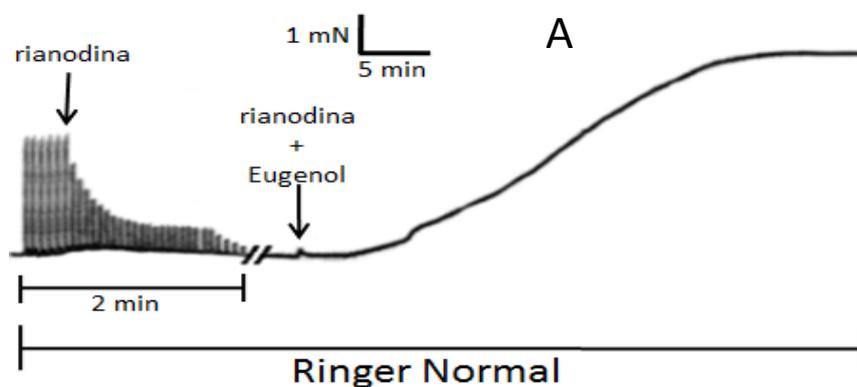


Figura 16 – Efeitos do eugenol após tratamento com rianodina sobre a tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer Normal. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média EPM.

### 1.5 – Efeitos da Rianodina sobre a ação do Eugenol em solução Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>

Os resultados demonstram que mesmo em solução ringer zero-Ca<sup>2+</sup>, o eugenol (5 mM) foi capaz de induzir o aumento da tensão de repouso na presença de rianodina (100 µM), estatisticamente igual ao eugenol controle (5 mM).

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>Abalo</b>	7,899±1,075	6
<b>Rianodina</b>	0,000±0,000	6
<b>Eugenol + Rianodina</b>	7,420±0,911	6
<b>Eugenol Controle</b>	7,164±1,075	6

Tabela 6 – Trabéculas tratadas com rianodina. Experimentos em ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

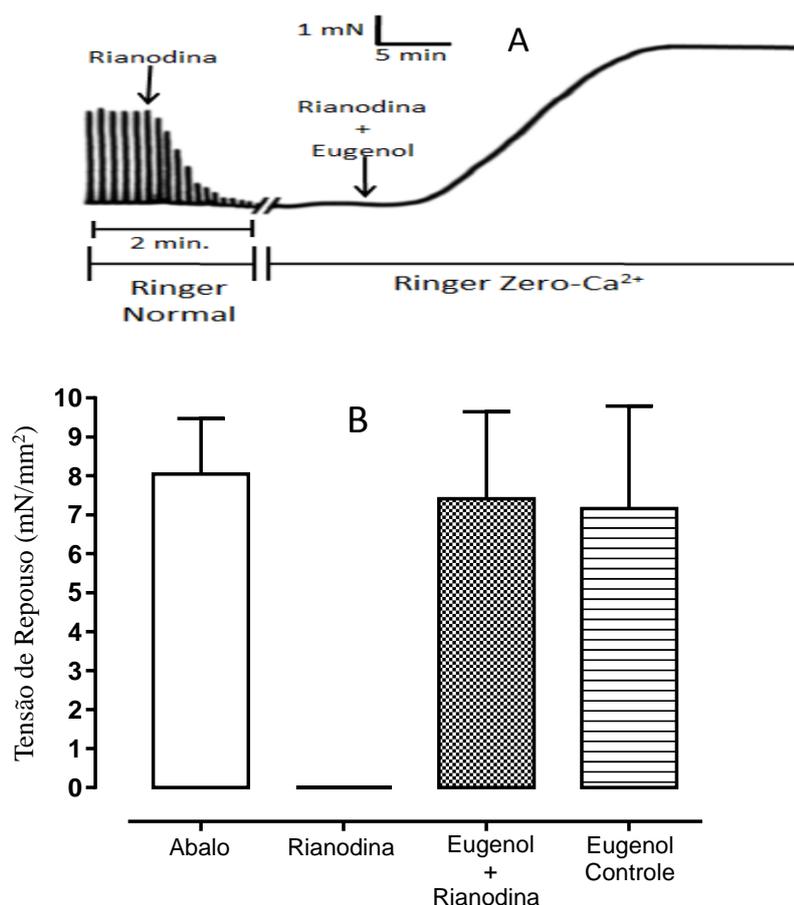


Figura 17 – Efeitos do eugenol após tratamento com rianodina sobre a tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

## 1.6 – Efeitos da Rianodina e Procaína na ação do Eugenol em solução Ringer Normal

Os resultados apresentados demonstram que mesmo na presença de dois bloqueadores da liberação de cálcio, rianodina (100  $\mu$ M) e procaína (10 mM), o eugenol (5 mM) foi capaz de induzir o aumento a tensão de repouso de trabéculas atriais, igual a tensão desenvolvida em eugenol controle (5 mM).

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>Abalo</b>	7,999 $\pm$ 1,175	6
<b>Rianodina + Procaína</b>	0,000 $\pm$ 0,000	6
<b>Eugenol + Rianodina + Procaína</b>	7,069 $\pm$ 0,444	6
<b>Eugenol Controle</b>	7,318 $\pm$ 0,529	6

Tabela 7 – Trabéculas tratadas com procaína. Experimentos em ringer normal. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

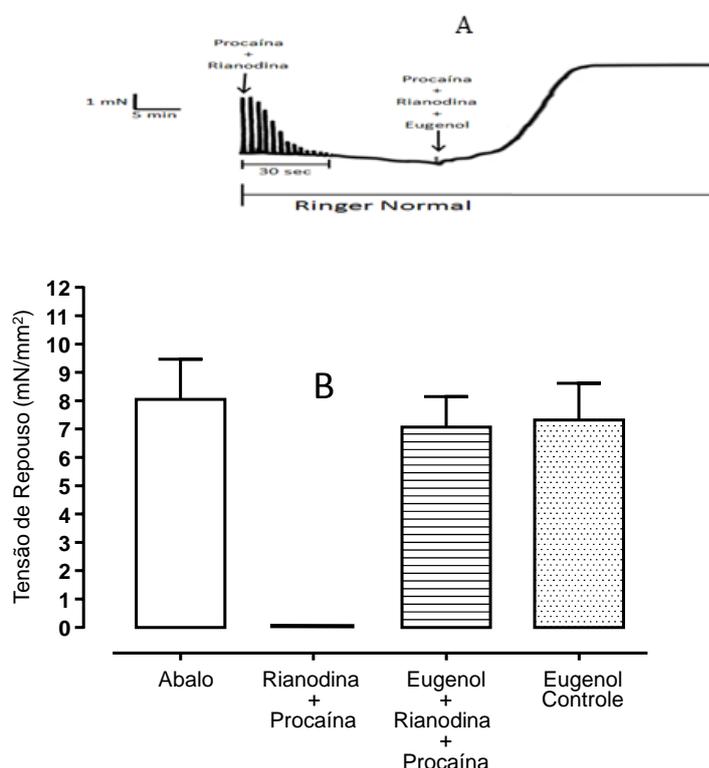


Figura 18 – Efeitos do eugenol após tratamento com rianodina e procaína sobre a tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer Normal. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

### 1.7 – Efeitos da Rianodina e Procaína na ação do Eugenol em solução Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>

Mesmo em solução ringer zero-Ca<sup>2+</sup> e na presença de dois bloqueadores da liberação de cálcio, rianodina (100 µM) e procaína (10 mM), o eugenol (5 mM) foi capaz de induzir o aumento a tensão de repouso de trabéculas atriais, igual a tensão desenvolvida em eugenol controle (5 mM).

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>Abalo</b>	8,021±1,200	6
<b>Rianodina + Procaína</b>	0,000±0,000	6
<b>Eugenol + Rianodina + Procaína</b>	7,205±0,582	6
<b>Eugenol Controle</b>	7,164±1,075	6

Tabela 8 – Trabéculas tratadas com procaína e rianodina .Experimentos em ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

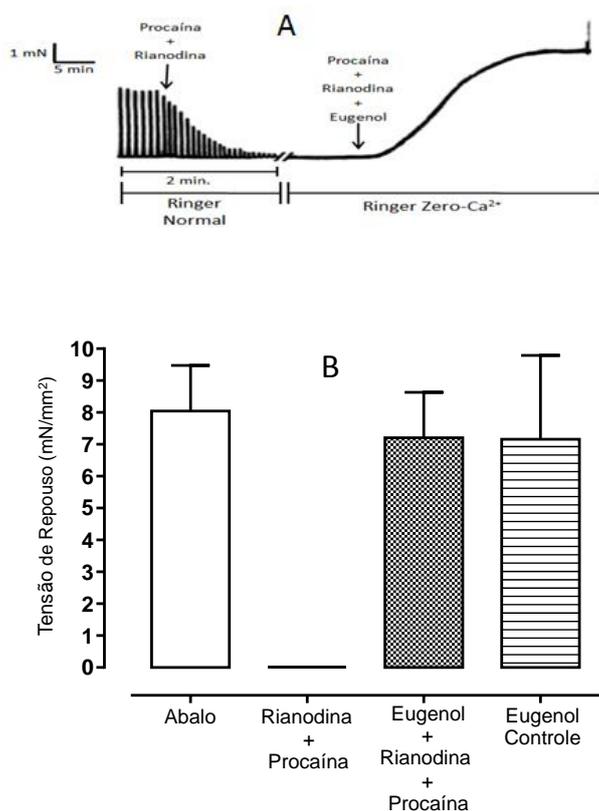


Figura 19 – Efeitos do eugenol após tratamento com rianodina e procaína sobre a tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

### 1.8 – Efeitos do BDM na ação do Eugenol em solução Ringer Normal

Os resultados indicam que o aumento da tensão de repouso induzida pelo eugenol (5 mM) é um estado ativo de ciclização das pontes cruzadas, uma vez que o BDM (30 mM) foi capaz de reduzir a tensão de repouso. O relaxamento induzido por BDM foi alcançado no tempo de 20 a 30 minutos após a adição deste a solução.

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>Procaína</b>	0,000±0,000	6
<b>Eugenol + Procaína</b>	7,698±0,933	6
<b>Eugenol + Procaína + BDM</b>	0,283±0,209	6
<b>Eugenol Controle</b>	7,318±0,529	6

Tabela 9 – Trabéculas tratadas com procaína e BDM. Experimentos em ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

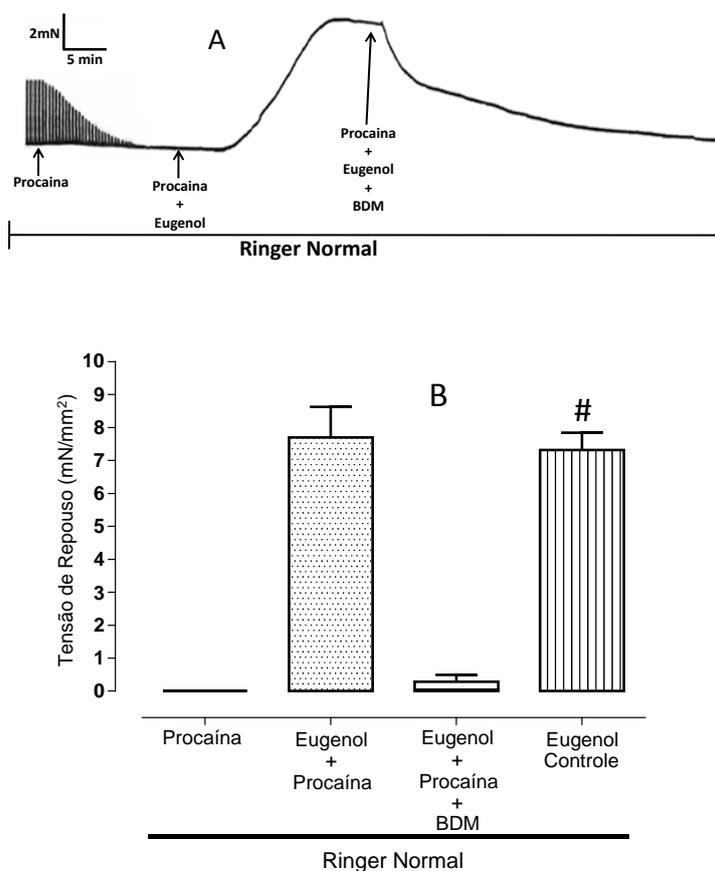


Figura 20 – Efeitos do eugenol após tratamento com procaína e BDM sobre tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer Normal. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

### 1.9 – Efeitos do BDM na ação do Eugenol em solução Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>

Os resultados indicam que o aumento da tensão de repouso induzida pelo eugenol (5 mM) é um estado ativo de ciclização das pontes cruzadas, uma vez que o BDM (30 mM) foi capaz de reduzir a tensão de repouso, e que este aumento é independente do influxo de Ca<sup>2+</sup> extracelular. O relaxamento induzido por BDM foi alcançado no tempo de 20 a 30 minutos após a adição deste a solução.

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>Procaína</b>	0,000±0,000	6
<b>Eugenol + Procaína</b>	6,955±0,897	6
<b>Eugenol + Procaína + BDM</b>	0,055±0,095	6
<b>Eugenol Controle</b>	7,164±1,075	6

Tabela 10 – Trabéculas tratadas com procaína e BDM. Experimentos em ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

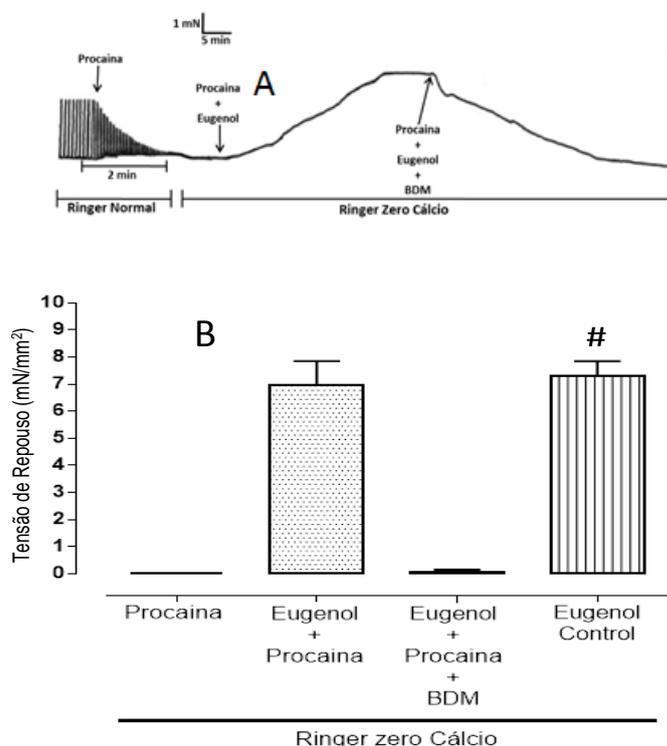


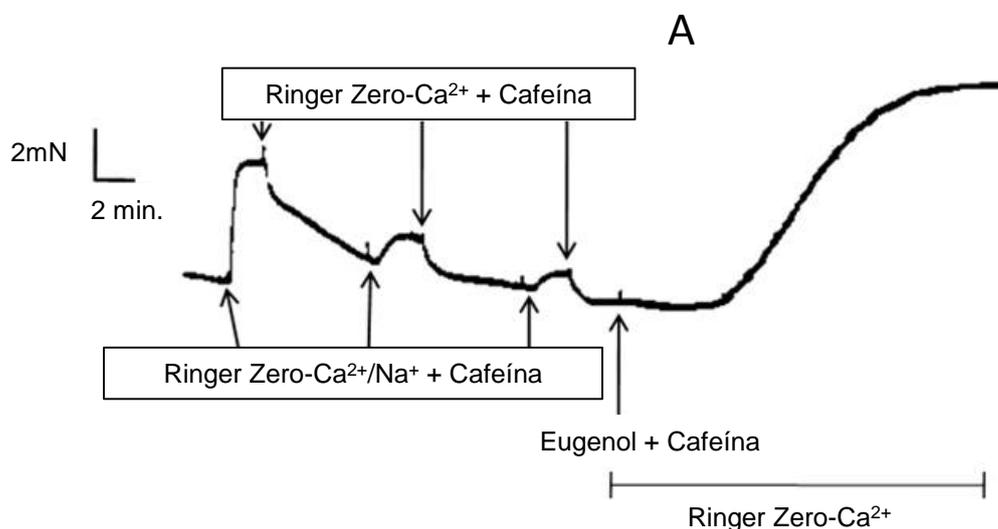
Figura 21 – Efeitos do eugenol após tratamento com procaína e BDM sobre tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

### 1.10 – Efeitos do Eugenol após o esgotamento do cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático por ação da cafeína em Ringer zero-Ca<sup>2+</sup> e Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>/Zero-Na<sup>+</sup>

Confirmando os resultados dos protocolos anteriores, mesmo após o esgotamento de cálcio do RS, induzido por Cafeína (30 mM), o eugenol (5 mM) foi capaz de induzir o aumento da tensão de repouso. A atividade dos trocadores de Na<sup>+</sup>/ Ca<sup>2+</sup> foi controlada em função da solução experimental (ringer zero-Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> e ringer zero-Ca<sup>2+</sup>) possibilitando identificar que a ação do eugenol (5 mM) não é por esta via. Em resumo a via pela qual atua o eugenol é independente de Ca<sup>2+</sup> extra ou intracelular.

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup></b>	0,000±0,000	8
<b>Cafeína (1)</b>	3,641±0,976	8
<b>Cafeína (2)</b>	0,482±0,252	8
<b>Cafeína (3)</b>	0,135±0,135	8
<b>Eugenol+Cafeína</b>	7,214±2,128	8
<b>Eugenol Controle</b>	7,318±0,529	8

Tabela 11 – Experimentos para esgotamento do Ca<sup>2+</sup> do RS por ação da cafeína. Os resultados são apresentados como média ± EPM.



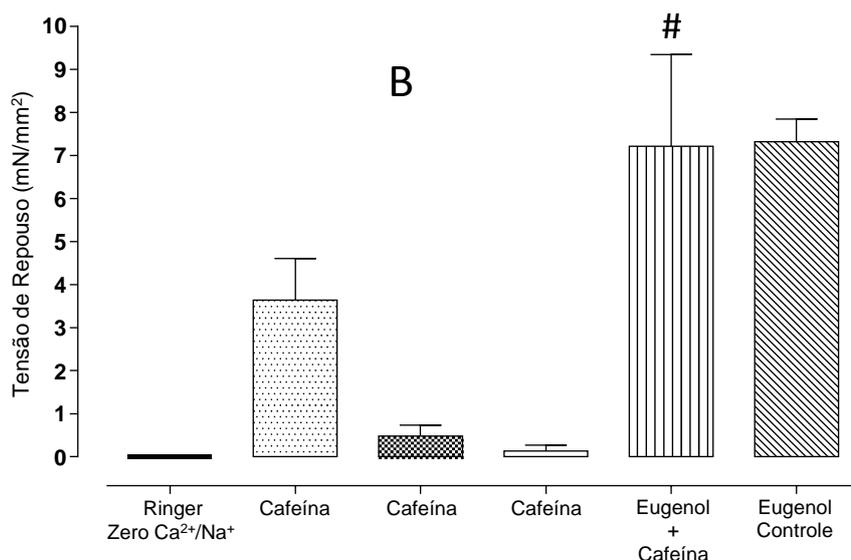


Figura 22 – Efeitos do eugenol após o esgotamento do cálcio armazenado no RS por ação da cafeína (30 mM) sobre a tensão de repouso desenvolvida por trabéculas de músculo atrial de ratos em preparações mantidas em solução de Ringer zero-Ca<sup>2+</sup>. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média ± EPM; # p<0,01; ANOVA (uma via) seguida pelo teste de Tukey, n=8; Eugenol+Cafeína vs Cafeína.

## 2 – Experimentos com Trabéculas de Músculo Atrial de rato permeabilizadas por saponina e/ou Triton X-100

### 2.1 – Efeitos do eugenol sobre a tensão de repouso em trabéculas atriais permeabilizadas por Saponina e Triton X-100

Os resultados apresentados em solução A (pCa4.0) indicam a força máxima das preparações. A força produzida em cafeína (30 mM) representa a ativação da maquinaria contrátil pelo Ca<sup>2+</sup> liberado a partir do RS. Eugenol (5 mM) foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso em solução R (alto EGTA), porém quando as trabéculas foram permeabilizadas por Triton X-100 a tensão induzida por eugenol é revertida.

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>pCa 4.0</b>	13,120±1,355	8
<b>Cafeína</b>	4,140±0,678	8
<b>Eugenol</b>	6,697±1,147	8
<b>Eugenol+Triton X-100</b>	-0,710±0,298	8

Tabela 12 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e Triton X-100. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

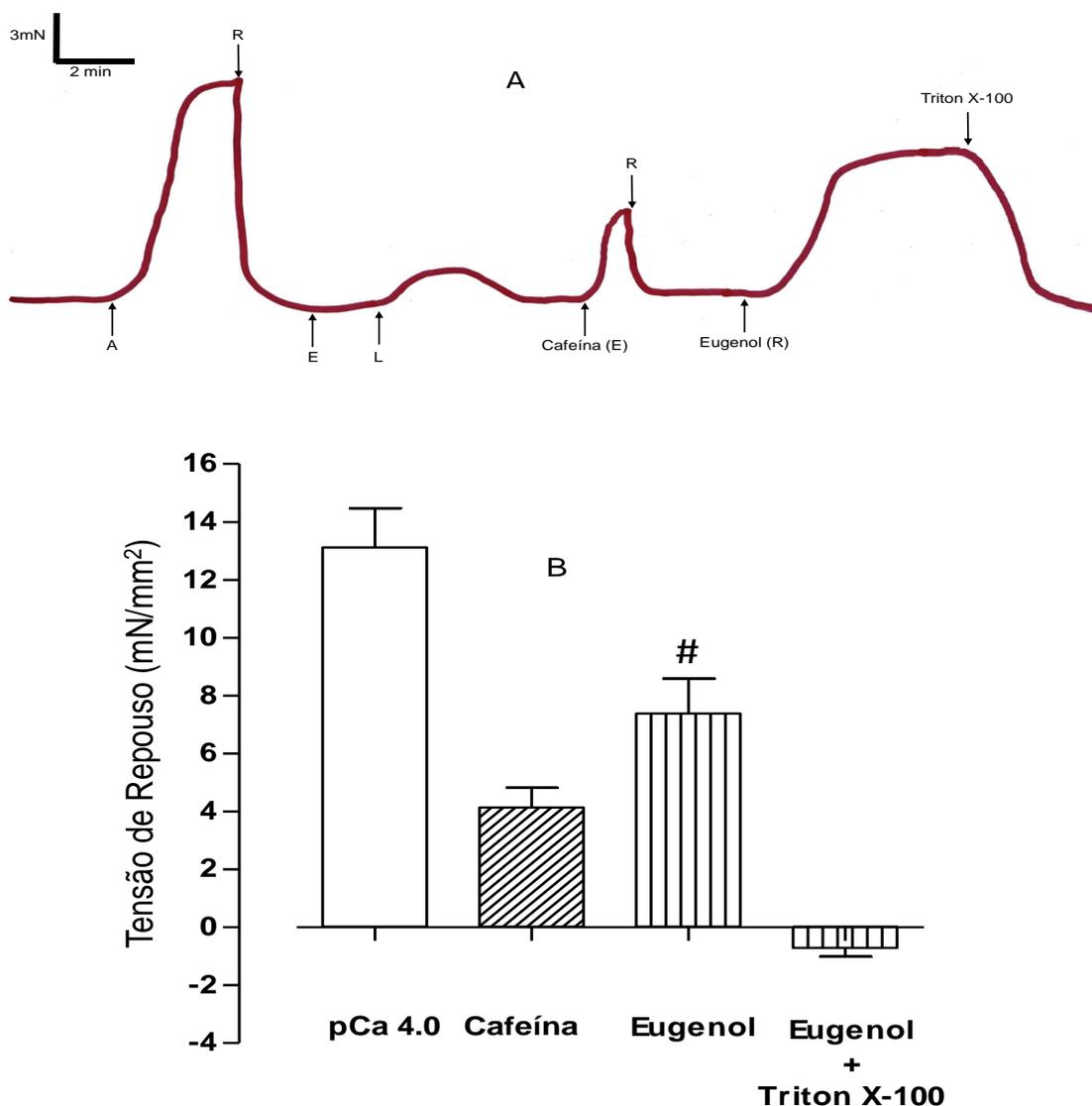


Figura 23 – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; #  $p < 0,01$ ; ANOVA e Tukey;  $n = 8$ ; Eugenol vs Cafeína; Eugenol vs Eugenol+Triton X-100.

## 2.2 – Efeitos do Vermelho de rutênio (RR) sobre a ação do eugenol em trabéculas permeabilizadas por saponina

O eugenol na presença de vermelho de rutênio foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso estatisticamente igual ao eugenol controle, reforçando os resultados obtidos anteriormente, indicando que a via pela qual atua o eugenol é independente de RyRs e por uma via independente de  $Ca^{2+}$ .

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>pCa 4.0</b>	14,515±1,589	8
<b>Eugenol + Vermelho de Rutênio</b>	7,824±1,874	8
<b>Eugenol Controle</b>	7,380±1,205	8

Tabela 13 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e tratadas com vermelho de rutênio. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

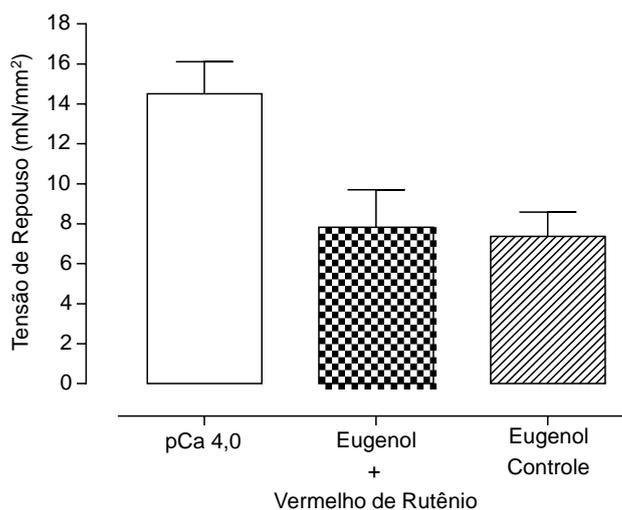


Figura 24 – Efeitos do eugenol (5 mM) sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas tratadas com vermelho de rutênio (10 µM). Os resultados são apresentados como média ± EPM.

### 2.3 – Efeito do BDM sobre a ação do eugenol em trabéculas permeabilizadas por Saponina

Os experimentos realizados com BDM (10 mM) e BDM (30 mM), demonstram que este composto induziu o relaxamento das preparações na presença de eugenol (5 mM), entretanto quanto maior a concentração de BDM maior foi o relaxamento. Com diferença estatística quando comparados ao eugenol controle (5 mM)

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>Eugenol</b>	7,222±0,781	8
<b>Eugenol + BDM (10mM)</b>	2,635±0,153	8
<b>Eugenol + BDM (30 mM)</b>	0,162±0,192	8
<b>Eugenol Controle</b>	7,380±1,205	8

Tabela 14 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e tratadas com vermelho de rutênio. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

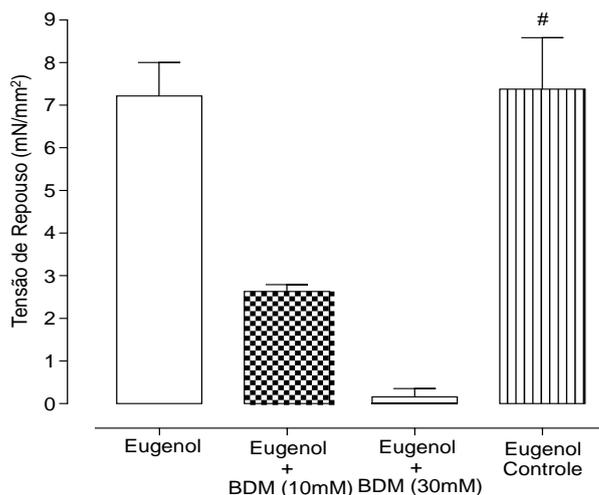


Figura 25 – Efeitos do eugenol (5 mM) sobre preparações de trabéculas atriais na presença de BDM (10 mM) e (30 mM). Os resultados são apresentados como média EPM; #  $p < 0,01$ ; teste t-Student;  $n = 8$ ; Eugenol+BDM 10 mM vs Eugenol Controle; Eugenol+BDM 30 mM vs Eugenol Controle.

#### 2.4 – Relação entre força e concentração de cálcio na presença e ausência de eugenol

Os resultados demonstram que o eugenol (5 mM) não é capaz de alterar a sensibilidade das proteínas contrateis ao  $\text{Ca}^{2+}$  em preparações permeabilizadas por Triton X-100.

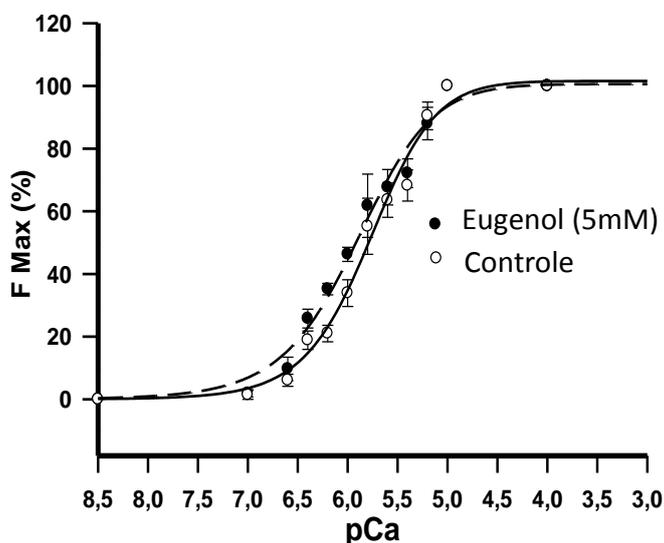


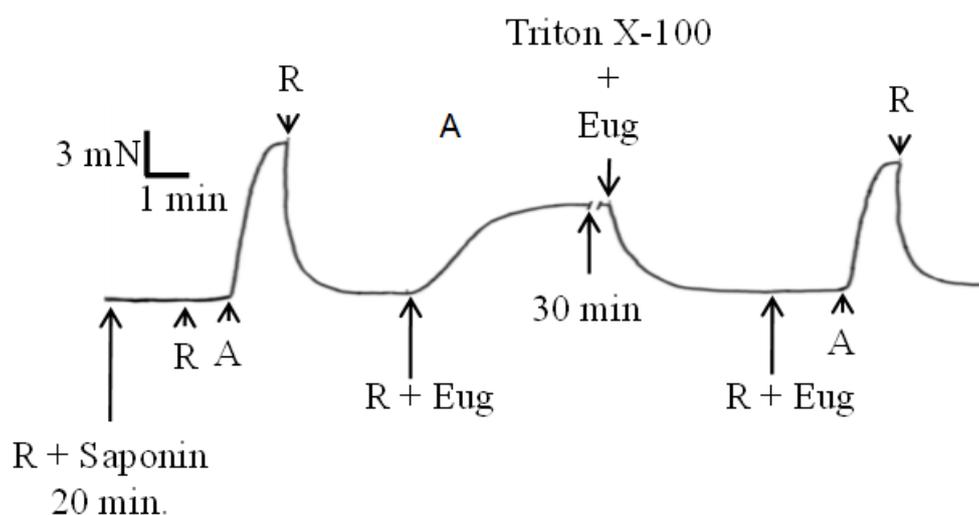
Figura 26: Relação entre força em concentrações diferentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , na ausência e presença de Eugenol em trabéculas permeabilizadas com Triton X-100. Os dados de força foram normalizados para percentual e apresentam Média e Desvio Padrão. Os valores, respectivamente, de força na ausência e presença de eugenol foram  $1.37 \pm 0.03$ ;  $1.60 \pm 0.2$   $\mu\text{M}$  e  $1.18 \pm 0.02$ ;  $1.24 \pm 0.17$   $\mu\text{M}$  ( $n=6$ ).

## 2.5 – Efeitos do eugenol sobre tensão de repouso de trabéculas atriais antes e depois de serem permeabilizadas com Triton X-100

Os resultados apresentados indicam que os íons  $\text{Ca}^{2+}$  liberados pela presença da cafeína (30 mM) foram totalmente quelados por EGTA (5 mM), demonstrando a efetiva ação deste composto. Mesmo em solução R o eugenol (5 mM) foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso em trabéculas permeabilizadas por saponina. Porém quando as trabéculas foram permeabilizadas com Triton X-100 a resposta ao eugenol (5 mM) desapareceu, o mesmo não foi observado em solução A, indicando que o Triton X-100 não altera a capacidade de ciclicização das pontes cruzadas.

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>pCa 4.0</b>	13,819±1,640	8
<b>Cafeína</b>	0,001±0,000	8
<b>Eugenol</b>	6,710±1,045	8
<b>Triton X-100</b>	0,000±0,000	8
<b>Eugenol (pós Triton)</b>	0,094±0,079	8
<b>pCa 4.0 (pós Triton)</b>	11,477±1,812	8

Tabela 15 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e Triton X-100, submetidas a cafeína em solução R, eugenol antes e depois de Triton X-100 e solução A antes e depois de Triton X-100. Os resultados são apresentados como média ± EPM.



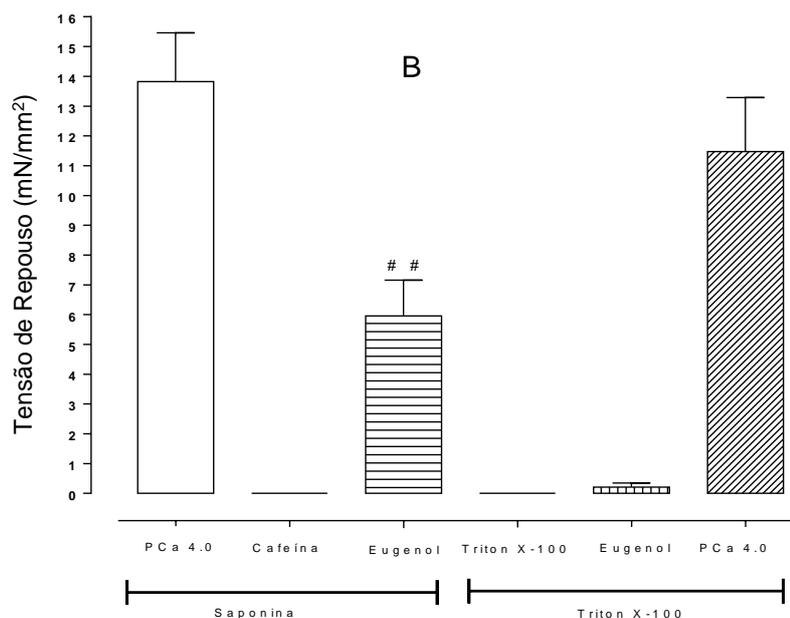


Figura 27 – Efeitos do eugenol sobre preparações de trabéculas atriais permeabilizadas com saponina (30 mg/ml) por 20 minutos e Triton X-100 (1% - vol/vol) por 10 minutos. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média EPM; #  $p < 0,01$ ; teste t-Student;  $n = 8$ ; Eugenol vs Eugenol pós Triton X-100; Eugenol vs Cafeína.

## 2.6 – Efeitos do tempo de exposição a saponina sobre a capacidade de produção de força induzida por Cálcio e Cafeína e elevação da Tensão de Repouso induzida pelo Eugenol

Os resultados demonstraram que, para obtenção da forma máxima é necessária a permeabilização. A resposta a cafeína (30 mM) ocorreu sem a permeabilização da membrana (tempo zero), porém a magnitude da resposta foi consideravelmente maior após a permeabilização. Já em relação ao eugenol (5 mM), observamos um decréscimo na resposta, ou seja, na capacidade deste óleo em induzir o aumento da tensão de repouso. No tempo de 80 minutos não observamos resposta.

Tempo	pCa 4.0	Cafeína	Eugenol	N
<b>Zero (intact)</b>	0,000±0,000	1,714±0,578	12,805±0,957	6
<b>20 minutos</b>	15,330±1,281	5,177±0,217	8,055±1,115	6
<b>40 minutos</b>	14,557±1,581	4,462±0,434	3,850±0,681	6
<b>60 minutos</b>	15,930±4,162	4,273±0,875	1,565±0,389	6
<b>80 minutos</b>	16,477±3,165	4,732±0,292	0,085±0,038	6

Tabela 16 – Trabéculas permeabilizadas em tempos diferentes (zero, 20, 40, 60 e 80 minutos) por saponina. Relação entre tempo de permeabilização e força e/ou tensão de repouso desenvolvida. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

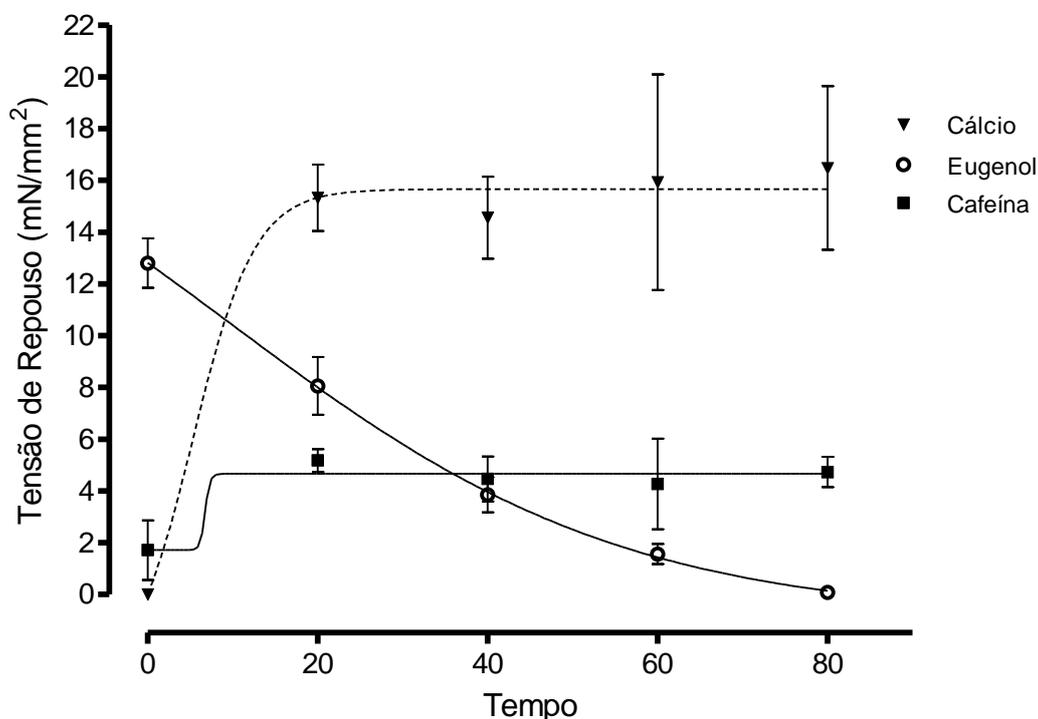


Figura 28 – Efeitos do Eugenol (5 mM) em trabéculas submetidas há tempos diferentes de exposição à saponina (30 $\mu$ g/ml). Dados mecânicos de produção de força em Solução A, Solução E acrescida de Cafeína (30 mM) e Solução R acrescida de Eugenol (5 mM). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

## 2.7 – Efeitos do 1,4-Ditiotreitol (DTT) sobre a ação do Eugenol

Nos experimentos realizados com DTT (100  $\mu$ M) pudemos observar que o aumento da tensão de repouso induzida por Eugenol (mM), na presença deste composto e em alta concentração de EGTA, foi superior ao eugenol controle (5 mM).

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>pCa 4.0</b>	13,120 $\pm$ 1,355	8
<b>Cafeína</b>	4,140 $\pm$ 0,678	8
<b>DTT</b>	0,000 $\pm$ 0,000	8
<b>Eugenol + DTT</b>	13,595 $\pm$ 1,854	8
<b>Eugenol Controle</b>	7,380 $\pm$ 1,205	8

Tabela 17 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e tratadas com DTT. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

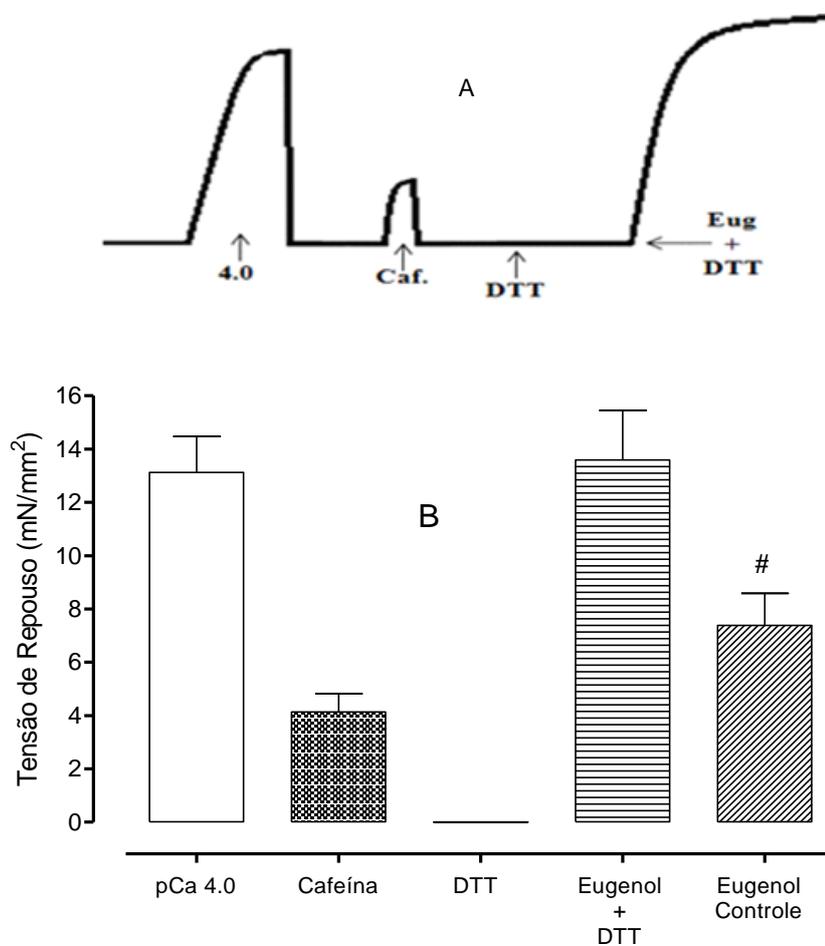


Figura 29 – Efeito do Eugenol (5 mM) em trabéculas permeabilizadas com saponina (30µg/ml) e incubadas com DTT (100 µM) (Ditiotreitól) por 20 minutos. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média EPM; #  $p < 0,01$ ; teste t-Student;  $n = 8$ ; Eugenol vs Eugenol+DTT.

## 2.8 – Efeitos da Colchicina (colch) sobre a ação do Eugenol

Os resultados demonstram que após o tratamento com colchicina (30 µM) o eugenol (5 mM) foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso a valores superiores aos observados em eugenol controle (5 mM), indicando que a ação deste composto potencializou de alguma forma a ação do eugenol.

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>pCa 4.0</b>	13,428±0,528	7
<b>Cafeína</b>	4,678±0,853	7
<b>Colchicina</b>	0,000±0,000	7
<b>Eugenol + Colchicina</b>	10,413±0,324	7
<b>Eugenol Controle</b>	7,554±0,878	7

Tabela 18 – Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina e tratadas com Colchicina. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

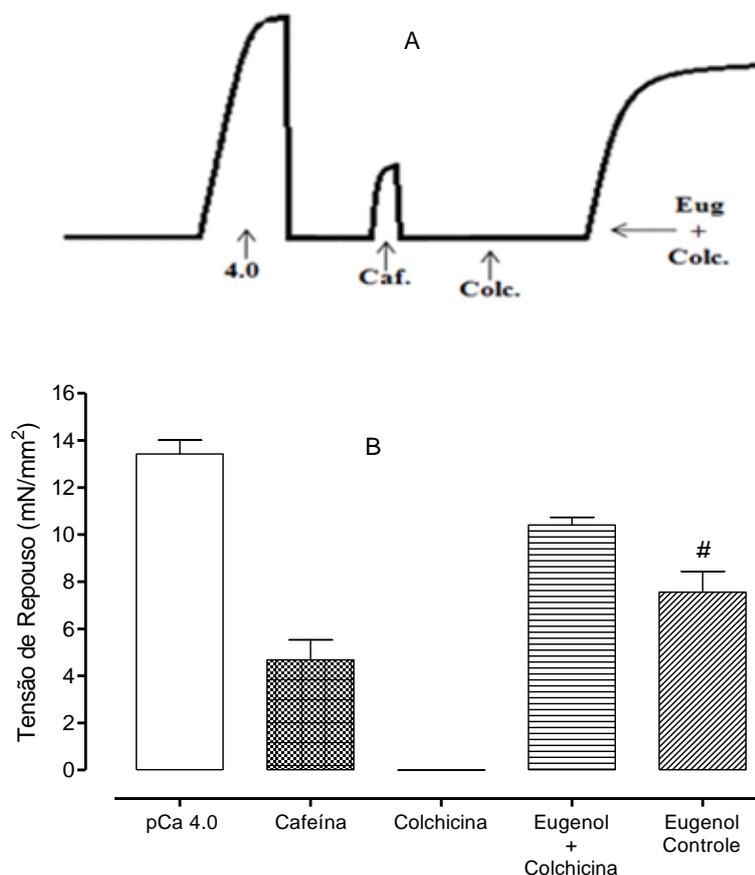


Figura 30 – Efeito do Eugenol em trabéculas permeabilizadas com saponina (30 $\mu$ g/ml) e tratadas com Colchicina (30 $\mu$ M) por 20 minutos. A – registro típico dos experimentos; B – dados de tensão de repouso. Os resultados são apresentados como média EPM; \*  $p < 0,05$ ; teste t-Student;  $n = 7$ ; Eugenol vs Eugenol+Colchicina.

## 2.9 – Experimentos com o produto da permeabilização das trabéculas e seu efeito sobre o Eugenol

Estes dados indicam que houve “reincorporação” das proteínas, que apenas o SUCO de proteínas é capaz de aumentar a tensão de repouso, porém na presença de Eugenol (5 mM) a tensão de repouso é estatisticamente igual ao eugenol controle (5 mM). Apenas a solução SUCO+COLCH foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso igual ao eugenol controle (5 mM), e quando adicionamos eugenol (5 mM) a esta solução observamos um aumento de tensão de repouso superior ao apresentado em eugenol controle (5 mM).

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>pCa 4.0</b>	13,428±0,582	8
<b>Cafeína</b>	0,000±0,000	8
<b>Eugenol</b>	0,000±0,000	8
<b>Suco (saponina)</b>	1,360±0,152	8
<b>Suco (saponina) + eugenol</b>	5,702±0,493	8
<b>Suco (sap e colch)</b>	5,794±0,784	8
<b>Suco (sap e colch) + eugenol</b>	8,786±0,673	8
<b>Eugenol controle</b>	6,835±0,526	8

Tabela 19 – Experimentos de reincorporação do produto da permeabilização por 80 minutos em trabéculas permeabilizadas por Triton X-100. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

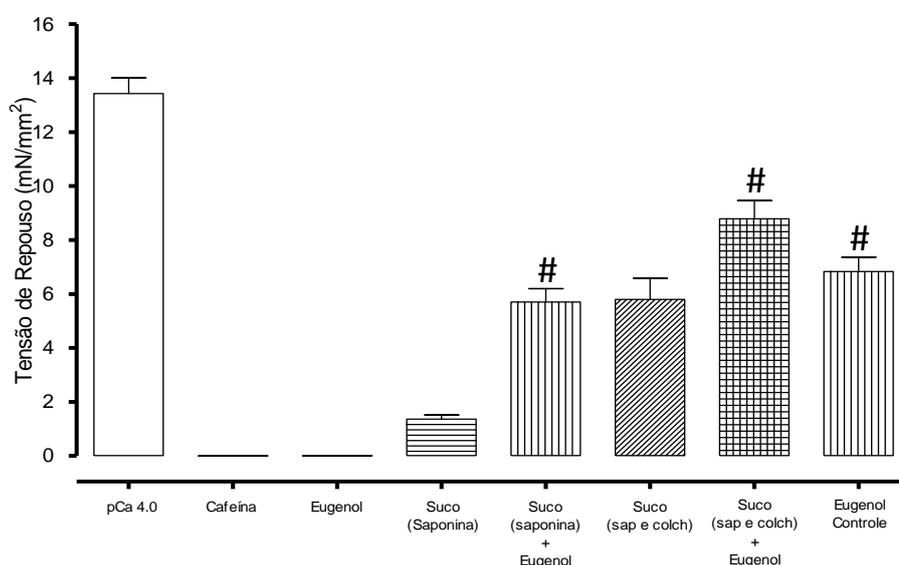


Figura 31 – Efeitos do Eugenol (5 mM) sobre a tensão de repouso desenvolvida pelas trabéculas atriais permeabilizadas com Triton X-100 (1% vol/vol) em solução contendo o produto da permeabilização por saponina (80 minutos) e solução contendo o produto da permeabilização por saponina (80 minutos) e colchicina (30 µM). Os resultados são apresentados como média ± EPM; SUCO vs SUCO + Eugenol; SUCO (Colch) vs SUCO (Colch) + Eugenol; SUCO + Eugenol vs SUCO (Colch) + Eugenol (\*p<0,05; # p<0,01; N = 8).

### 3 – Experimentos para identificação das possíveis vias de ação do Eugenol

#### 3.1 – Possível envolvimento da via p38 MAPk

##### 3.1.1 – Curva dose resposta ao arsenito de sódio

Nossos resultados demonstram que de forma concentração dependente o arsenito (1, 3, 5, 7 e 10 mM) foi capaz de reverter a tensão de repouso induzida

por eugenol (5 mM). A partir destes dados foi possível determinar a concentração deste composto a ser utilizada em nossos experimentos (EC50).

[Arsenito]	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>1 mM</b>	7,609±1,312	8
<b>3 mM</b>	9,421±0,916	8
<b>5 mM</b>	7,788±1,198	8
<b>7 mM</b>	2,885±0,718	8
<b>10 mM</b>	0,000±0,000	8

Tabela 20 – Curva dose resposta ao arsenito na presença de eugenol (5 mM) em trabéculas intactas. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

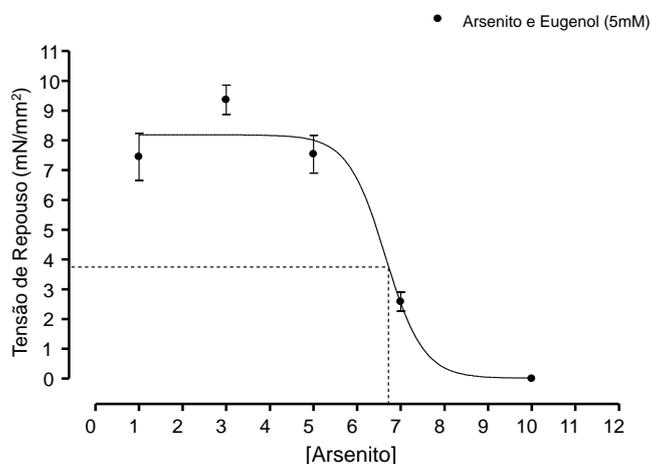


Figura 32 – Efeitos do arsenito na presença de eugenol (5 mM), curva dose resposta. Os experimentos foram realizados em trabéculas intactas e solução Ringer Normal (IC50=6,78 mM). Os resultados são apresentados como média ± EPM, n=8.

### 3.1.2 – Experimentos com Arsenito: recuperação após ação do Arsenito

Os resultados demonstram que o arsenito de sódio (7 mM) foi capaz de abolir o twitch (contração) induzida por estímulos elétricos indiretos. Após a lavagem da preparação, as trabéculas foram capazes de responder a estimulação elétrica, produzindo força menor que a observada antes da encubação com arsenito de sódio. O eugenol (5 mM) foi capaz de induzir o aumento da tensão de repouso após lavarmos a preparação.

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>Twitch</b>	4,487±0,399	8
<b>Arsenito (7 mM)</b>	0,000±0,000	8
<b>Recuperação</b>	1,982±0,575	8
<b>Eugenol (5 mM)</b>	5,198±0,321	8

Tabela 21– Resultados dos experimentos para determinar se a toxicidade do arsenito de sódio poderia estar determinando a resposta ao eugenol. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

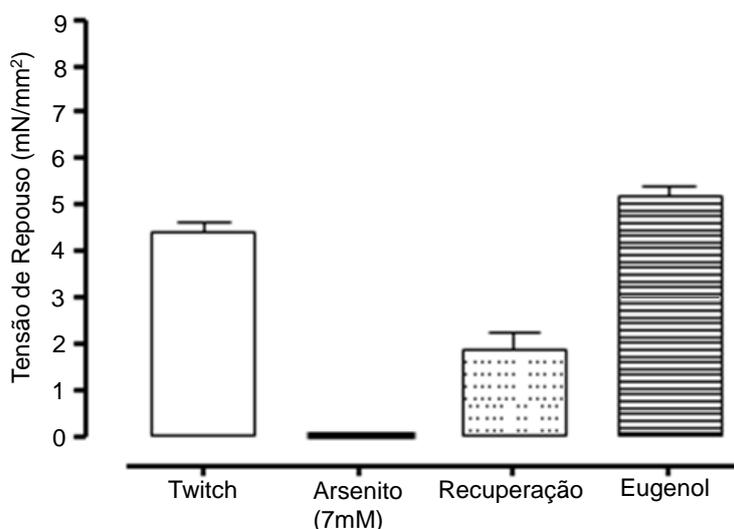


Figura 33 – Efeitos do Eugenol na presença e ausência de Arsenito. As trabéculas foram estimuladas eletricamente, à solução foi adicionado Arsenito (7 mM) (de acordo com IC50). Após 20 minutos a preparação foi lavada e estimulada novamente. Após foi adicionado Eugenol (5 mM) a solução ringer normal. Os experimentos foram realizados com trabéculas intactas. Os resultados são apresentados como média ± EPM. n=8.

### 3.1.3 – Experimentos com Arsenito: fibras permeabilizadas com saponina

Nossos resultados demonstraram que, em preparações permeabilizadas com saponina, o arsenito de sódio (7 mM) não foi capaz de alterar a ciclização das pontes cruzadas na presença de Ca<sup>2+</sup> (solução A). Em trabéculas permeabilizadas a capacidade do eugenol (5 mM) em aumentar a tensão de repouso foi reduzida na presença de arsenito de sódio (7 mM), resultado é estatisticamente menor que o eugenol controle (5 mM).

	mN/mM <sup>2</sup>	N
<b>pCa 4.0</b>	12,185±1,890	8
<b>Arsenito (7 mM)</b>	2,615±0,420	8
<b>pCa 4.0 + arsenito (7 mM)</b>	12,301±1,509	8
<b>Eugenol (5 mM) + arsenito (7 mM)</b>	2,683±0,321	8
<b>Eugenol controle</b>	6,912±1,010	

Tabela 22– Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina. Encubação com arsenito de sódio (7 mM). Os resultados são apresentados como média ± EPM.

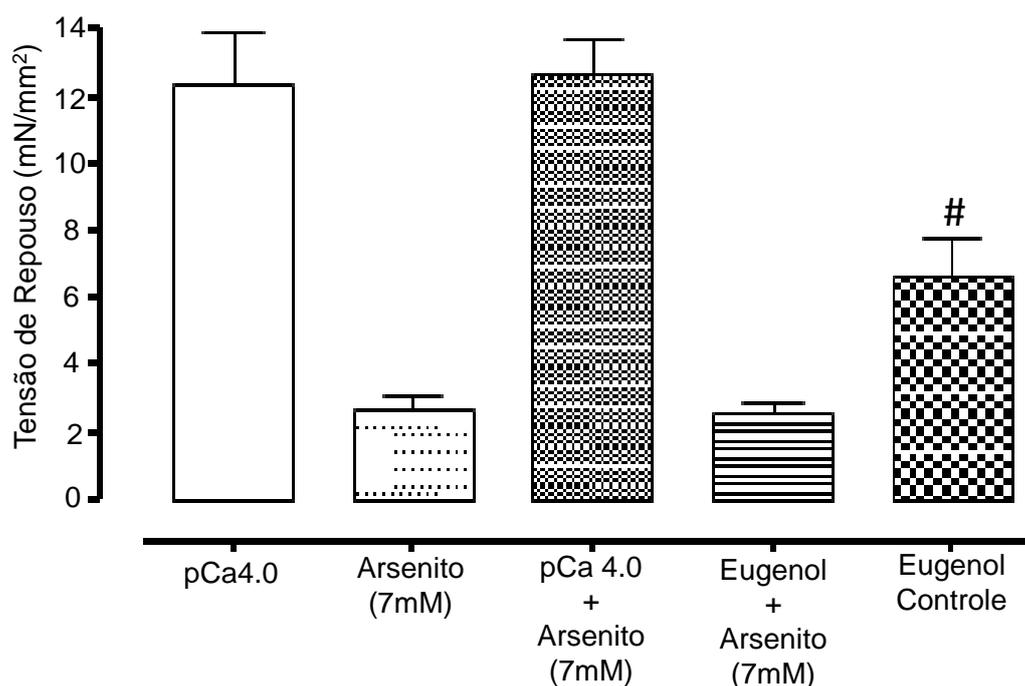


Figura 34 – Efeitos do Eugenol na presença e ausência de Arsenito. Os experimentos foram realizados com trabéculas permeabilizadas por saponina (30µg/ml) por 20 minutos; incubada em arsenito (7 mM) por 30 minutos. Os resultados são apresentados como média EPM; # p<0,01; teste t-Student, n=8; pCa 4.0 vs pCa4.0+Arsenito; Eugenol+Arsenito vs Eugenol Controle.

### 3.1.4 – Efeitos do arsenito em trabéculas permeabilizadas por Triton X-100

Em preparações permeabilizadas com Triton X-100, o Arsenito não foi capaz de alterar a ciclização das pontes cruzadas na presença de Ca<sup>2+</sup> (solução A. Em solução SUCO o eugenol (5 mM) foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso, porém quando adicionamos arsenito de sódio (7 mM) a solução, este foi capaz de reverter a tensão de repouso induzida por eugenol. Os

resultados de eugenol em solução SUCO acrescida de arsenito de sódio são estatisticamente menores que o eugenol controle (5 mM).

	mN/mm <sup>2</sup>	N
<b>pCa 4.0</b>	12,800±1,832	8
<b>pCa 4.0 + arsenito (7 mM)</b>	14,132±1,799	8
<b>Eugenol (5 mM) + SUCO</b>	7,045±1,909	8
<b>Eugenol (5 mM) + SUCO + arsenito (7 mM)</b>	1,125±0,281	8
<b>Eugenol controle</b>	6,987±1,032	

Tabela 23– Experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por Triton X-100, utilizando a solução com o produto da permeabilização de trabéculas por 80 minutos em saponina. Os experimentos foram realizados na presença e ausência de arsenito de sódio (7 mM). Os resultados são apresentados como média ± EPM.

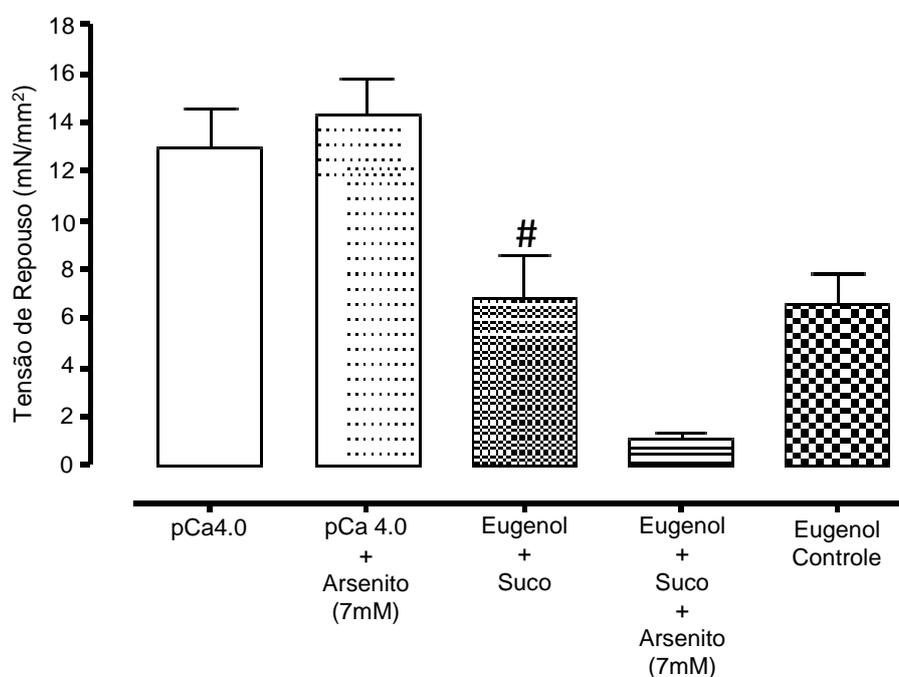


Figura 35 – Efeitos do Eugenol na presença e ausência de Arsenito. As trabéculas foram permeabilizadas com Triton X-100 (1% - vol/vol) por 10 minutos. As trabéculas foram expostas a pCa 4.0 na ausência e presença de Arsenito e expostas a Eugenol + SUCO na presença e ausência de Arsenito. Os resultados são apresentados como média EPM; # p<0,01; teste t-Student, n = 8; Eugenol+Suco vs Eugenol+Suco+Arsenito.

### 3.2 – Redução da concentração de ATP intracelular por ação do eugenol

Os resultados demonstraram que de forma tempo dependente o eugenol é capaz de reduzir a concentração de ATP.

	$\mu\text{Mol ATP/g}$	N
<b>C 0</b>	0,882 $\pm$ 0,079	5
<b>T 0</b>	0,798 $\pm$ 0,143	5
<b>C 30</b>	0,844 $\pm$ 0,114	5
<b>T 30</b>	0,524 $\pm$ 0,097	5
<b>C 60</b>	0,849 $\pm$ 0,026	5
<b>T 60</b>	0,346 $\pm$ 0,112	5

Tabela 24 – Dosagem de ATP, valores expressos em  $\mu\text{M}$  de ATP por grama de proteína. A concentração de ATP foi medida na ausência (C) e presença (T) de eugenol (5mM) nos tempos 0, 30 e 60 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

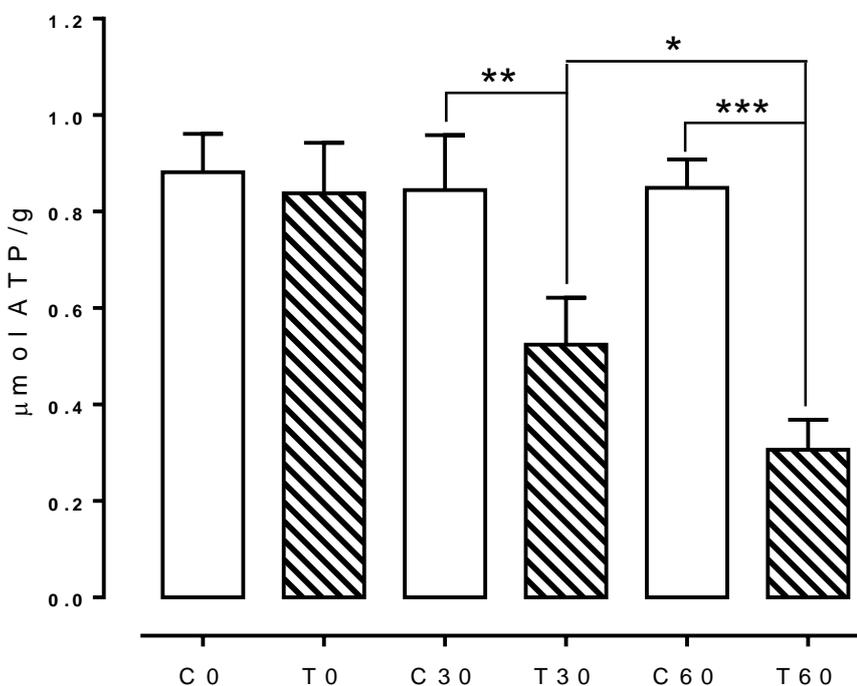


Figura 36 – O efeito do eugenol sobre a concentração de ATP em músculo atrial. A concentração de ATP foi medida na ausência (C) e na presença (T) de eugenol, a 0, 30 e 60 minutos. Os valores são expressos em  $\mu\text{mol}$  de ATP por g de proteína. Os símbolos representam diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ): \* E 30 vs E 60; \*\* C30 vs E30; \*\*\* C60 vs E 60.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que, em trabéculas de músculo atrial submetidas à estimulação elétrica, o eugenol foi capaz de inibir completamente a contração isométrica desenvolvida. Além disso, nas concentrações utilizadas, o eugenol, foi capaz de induzir aumento na tensão de repouso mesmo na presença de bloqueadores dos RyRs. Nos experimentos com trabécula de músculo atrial permeabilizadas por saponina, o eugenol foi capaz de induzir o aumento da tensão de repouso, em condições experimentais que levam a crer ser por uma via independente de cálcio, porém quando as preparações foram tratadas com Triton X-100, a resposta ao eugenol desapareceu, indicando que este óleo não atua diretamente nas proteínas contrateis e que possivelmente depende de um agente citosólico solúvel.

Os eventos que ocorrem entre o potencial de ação na fibra muscular e sua contração são definidos como sendo o processo de Acoplamento Excitação-Contração (AEC) (Bers, 2002). Entre os íons envolvidos no complexo mecanismo de trabalho do coração, o cálcio pode ser, talvez, considerado como o mais importante. Ele é crucial para os mecanismos que habilitam as câmaras cardíacas do coração a se contraírem e a se relaxarem, um processo denominado acoplamento excitação-contração (Bers, 2002).

É fato que o cálcio tem um papel fundamental como agente desencadeador da contração cardíaca, como sugerido inicialmente por Ringer em 1883 (Ringer, 1883). Um modelo descritivo tem sido formulado para explicar as propriedades funcionais da célula cardíaca que envolve todos os eventos que se iniciam com o potencial de ação e resultam no aumento de  $Ca^{2+}$  e a ativação das proteínas contrateis (Schouten et al., 1989). Em miócitos atriais, a liberação de cálcio a partir do RS durante o processo de AEC ocorre primariamente através dos RyRs (Kockskämper et al., 2001; Sheehan and Blatter, 2003).

O eugenol, além de ser o principal constituinte do óleo de cravo, também é componente constituinte dos óleos essenciais ou extratos de muitas outras plantas, como a canela e o manjeriço (Thompson et al., 1989; Wrigh et al., 1995). Ao longo dos anos, o eugenol tem sido utilizado como valiosa ferramenta na tentativa de melhor elucidar os eventos relacionados ao processo de AEC. Trabalhos realizados com músculos papilares de ratos demonstraram que o

eugenol em baixas concentrações (0,01 – 0,5 mM), apresenta ação inotrópica negativa agindo como bloqueador de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L, mas incapaz de afetar a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase miosínica (Damiani et al., 2004).

Em outro estudo, foram investigados os efeitos do eugenol em elevadas concentrações (1 – 10 mM), sobre o RS bem como sobre o aparato contrátil de fibras musculares esqueléticas de rã e quimicamente desmembranadas. Os resultados mostraram que o eugenol (5 mM) foi capaz de induzir contrações possivelmente através da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Além disso, os autores concluíram que a contração muscular induzida pelo eugenol envolveria, pelo menos, dois mecanismos para a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS: um mecanismo relacionado com a ativação dos RyRs e, um outro mecanismo através de uma via sensível à heparina ou, mais precisamente, uma via  $\text{IP}_3\text{Rs}$  (Lofrano-Alves et al., 2005).

Os experimentos com trabécula de músculo atrial intacto e sob estimulação condição-padrão, mostraram que o eugenol em diferentes concentrações (1 -10 mM), foi capaz de abolir o abalo muscular, bem como, de forma concentração-dependente, foi capaz de induzir uma elevação da linha de tensão de repouso. Tal evento caracteriza, portanto, a capacidade do eugenol, nas concentrações utilizadas, em induzir aumento da tensão de repouso em músculo atrial. Tais resultados são similares aos encontrados em preparações com músculo esquelético de rã (Lofrano-Alves, et al., 2005).

No músculo cardíaco, a força da contração é dependente da concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ . É atualmente aceito, que o cálcio requerido para a contração provem de duas fontes: 1) o influxo de cálcio extracelular através dos canais lentos de  $\text{Ca}^{2+}$  (DHPRs) e, 2) do estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RyRs, principalmente). O cálcio proveniente do meio extracelular passa ao interior da célula e dispara a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático. É estimado que cerca de 30% do  $\text{Ca}^{2+}$  requerido para elevar a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , necessárias para o desenvolvimento da força máxima, é derivado do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através do sarcolema e o restante 70% representa o  $\text{Ca}^{2+}$  ativador derivado do retículo sarcoplasmático (Sperelakis *et al.*, 1996). Uma série de informações pode ser obtida a partir dos registros de experimentos onde utilizamos uma droga

bloqueadora de canais liberadores de cálcio do RS. Tem sido descrito que a inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  por eugenol (Damiani et. al., 2004) ou por  $\text{Ni}^{2+}$  resulta em uma elevada concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelo retículo sarcoplasmático (Komai & Rusy, 1993). Tal raciocínio é exatamente o oposto à noção de que a inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  invariavelmente resultaria numa diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS.

Nossa hipótese, tendo como base resultados anteriores, é a de que o aumento da tensão de repouso induzida pelo eugenol seja resultado de uma via independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Um dos principais efeitos da procaína sobre célula muscular é a capacidade de inibir a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (Endo, 1977; Stephenson & Wendt, 1986). Assim, utilizamos procaína para observar os efeitos do eugenol sobre a liberação de cálcio pelo RS (Zahradníková & Palade, 1993). Nossos resultados mostram que a procaína foi capaz de bloquear completamente a contração isométrica (abalo) desenvolvida pelas trabéculas de músculo atrial, sob estimulação indireta; porém quando o eugenol foi adicionado à solução, foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso. Tais resultados mostram que a procaína efetivamente produziu um efeito bloqueador nos RyRs do retículo sarcoplasmático, mas quando o eugenol foi adicionado a trabécula foi capaz de aumentar a tensão de repouso. Assim sendo, os resultados sugerem que o eugenol está atuando por uma via diferente da dos RyRs.

O processo de AEC envolve os canais de cálcio tipo L voltagem-dependentes (DHPRs) os quais permitem a entrada de cálcio e cuja atividade resulta na liberação de cálcio via RyRs (Xu et al., 1994) ou de outro canal liberador de cálcio do RS (Moore et al., 2004). Dessa forma, a utilização de uma solução sem cálcio (solução de ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ ) nos deu a certeza de que o cálcio extracelular não estaria efetivamente contribuindo para o processo de liberação de cálcio induzida por cálcio. Além disso, a adição de procaína à solução não permitiria a liberação de cálcio através dos RyRs do RS. Entretanto, quando nessas condições experimentais o eugenol foi adicionado à preparação, mais uma vez, foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso. Tais resultados mostram que a despeito do fato do processo de CICR não pode ocorrer pela ausência completa do cálcio extracelular bem como, a pouca probabilidade de ocorrência da liberação de cálcio pelos RyRs devido ao

bloqueio pela procaína, mesmo assim, o eugenol foi capaz de induzir significativa força de contração.

A regulação do processo de acoplamento excitação-contração é orquestrado por meio de um programa espacialmente definido de canais iônicos e trocadores, os quais, controlam rigorosamente a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da célula bem como a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do retículo sarcoplasmático. Os RyRs são os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  em maior abundância no interior do miócito cardíaco. O  $\text{Ca}^{2+}$  assim originado aumenta a contração dos filamentos através da sua interação com a troponina C e, subsequente aumento da interação actina-miosina (Williams et al., 1992; Minamikawa et al., 1997). Dentro dessa linha de raciocínio, desenvolvemos um protocolo onde as trabéculas atriais, após período de estabilização e mantidas sob estimulação-padrão, foram tratadas com rianodina (100  $\mu\text{M}$ ), um conhecido antagonista de RyRs. Imediatamente após a adição de rianodina, observamos a completa abolição da força de contração isométrica desenvolvida pelo músculo atrial. Quando adicionamos eugenol (5 mM) a essa solução, este foi capaz de induzir significativo aumento da tensão de repouso. Essa tensão induzida pelo eugenol, apresenta a mesma amplitude desenvolvida pelo eugenol (5 mM) na condição de controle. Não obstante, repetimos os mesmos procedimentos experimentais em solução ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ , para confirmarmos a não cooperação do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular na capacidade do eugenol em aumentar a tensão de repouso. Nestas condições experimentais obtivemos os mesmos resultados observados em solução ringer normal. Tais resultados sugerem que a ação do eugenol não é através dos RyRs, e possivelmente por uma via independente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Por outro lado, considerando que os resultados abordados até o momento são contraditórios em relação aos descritos na literatura, desenvolvemos um novo protocolo onde as trabéculas atriais, após período de estabilização e mantidas sob estimulação-padrão em ringer normal, foram tratadas com rianodina (100  $\mu\text{M}$ ) e procaína (10 mM), ambos bloqueadores da atividade dos RyRs. E novamente controlando a cooperação do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, realizamos os experimentos em solução ringer normal e ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ . Os resultados obtidos nos protocolos em que utilizados os bloqueadores isoladamente, repetiram-se mesmo na presença de ambos, ou seja, imediatamente após o tratamento, observamos a completa abolição de força da contração isométrica

desenvolvida pela trabécula atrial, porém, quando a esta preparação foi adicionado eugenol (5 mM), este composto foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso.

O BDM apresenta um efeito inotrópico negativo tanto sobre músculo cardíaco intacto quanto sobre o permeabilizado (Li et al., 1985; Daly et al., 1987). Este composto não apresenta nenhum efeito maior tanto sobre a atividade elétrica do coração quanto sobre a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (Mulieri & Alpert, 1984; Li et al., 1985). O BDM reduz a sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ , deslocando a curva de sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  para a direita (Li et al., 1985). Ele também inibe a formação das pontes cruzadas (Mulieri & Alpert, 1984; Blanchard et al., 1984). Assim sendo, as miofibrilas parecem ser o principal sitio de atuação do BDM. Por outro lado, a ação do BDM é dependente da concentração (Tripathy et al., 1999); visto que em baixas concentrações (<2 mM) reduz a força através da redução do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente enquanto que em altas concentrações (10 e 30 mM) ele também afeta a ciclização das pontes cruzadas, inibindo-as, por manter estabilizado o estado AM.ADP.Pi (Herrmann et al., 1992; Fryer et al., 1988), bem como diminui a sensibilidade das miofibrilas ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Em nossos experimentos, utilizamos BDM 30 mM, em trabéculas estimuladas eletricamente, 10 mM e 30 mM em trabéculas permeabilizadas por ação da saponina. Uma vez que uma das ações do BDM é a redução do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente, realizamos o protocolo com fibras intactas em solução ringer normal e ringer zero- $\text{Ca}^{2+}$ , e na presença de procaína. Nossos resultados, em trabéculas intactas, mostraram que, após o tratamento com BDM, o aumento da tensão de repouso induzida pelo eugenol foi revertida. Da mesma forma, nos experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas, os resultados demonstraram que quando a trabécula foi tratada com BDM (10 mM) mais eugenol (5 mM), obtivemos uma redução significativa da tensão de repouso em comparação àquela desenvolvida pela condição controle (eugenol 5 mM). Contudo, quando a trabécula foi tratada com BDM (30 mM) mais eugenol (5 mM), observamos que o eugenol foi incapaz de induzir aumento da tensão de repouso. Esses resultados, nos possibilitam hipotetizar que o BDM em altas concentrações (30 mM) foi capaz inibir a ciclização das pontes cruzadas (Fryer, et al., 1988; Blanchard et al., 1990; Maylie & Hui, 1991; Herrmann, et al., 1992; Kagawa, et al., 1995) e, conseqüentemente, o eugenol, nestas condições experimentais, foi incapaz de aumentar a tensão de repouso.

Assim sendo, nossos resultados em preparações com utilização do BDM sugerem que este composto ao induzir o completo relaxamento da trabécula atrial, sugere que a ação do eugenol seria resultado de um estado ativo de ciclização de pontes cruzadas, e não de um estado de “*rigor mortis*”.

A possibilidade de esgotamento do  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado no RS foi observada por Bradley et al (2002) em células musculares lisas. O RS foi esgotado de  $\text{Ca}^{2+}$  por ação da cafeína (10 mM) aplicada sequencialmente a intervalos de 1 a 2 minutos. Por outro lado, a cafeína (30 mM) foi utilizada em experimentos com músculos de crustáceos, resultando na ativação dos RyRs e a consequente liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  estocado (Lea, J. T., 1996). A cafeína tem a propriedade de ligar-se ao RyRs de forma efetiva, em outras palavras, enquanto houver cafeína na solução estes receptores permanecem ativados o que possibilita a liberação constante de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (Bradley et al., 2002). Uma segunda via tem sido proposta como um mecanismo que contribui para CICR cardíaco, o *trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$*  (Bridge et al., 1990). Este trocador, representa um mecanismo pelo qual os movimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  através do sarcolema estão acoplados a movimentos recíprocos de  $\text{Na}^+$ , com uma estequiometria de  $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$  (Brenner, 1993). Em nossos experimentos com cafeína foi capaz de promover o esgotamento do RS, observado pela ausência de resposta a presença de cafeína na solução. Mesmo após este esgotamento, a trabécula, quando exposta a Eugenol (5 mM) foi capaz de aumentar a tensão de repouso, tensão esta que não é resultado da cooperação com os trocadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , confirmando os dados anteriores de que a ação do eugenol é independente de RyRs e por uma via independente de íons  $\text{Ca}^{2+}$ .

A capacidade contrátil do miocárdio pode ser alterada por um dos três seguintes modos: 1) pela variação da quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  disponível para ativar os miofilamentos, 2) pela alteração da afinidade de ligação do filamento ao  $\text{Ca}^{2+}$  e, 3) pela alteração da cinética dos filamentos quando da ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  (Ford, 1991). Experimentos realizados através da técnica de permeabilização da membrana (“*skinned fibers*”) possibilitam que as propriedades mecânicas das proteínas contráteis sejam investigadas sem que haja interferência dos mecanismos do processo de AEC. Estudos em fibras permeabilizadas provêm informações sobre as propriedades mecânicas ativas e passivas do aparato miofibrilar (Matsubara et al., 1989).

Os experimentos com fibras permeabilizadas, portanto, na ausência de estimulação elétrica, permitem a análise das propriedades do ciclo de pontes transversas haja vista que a produção da força observada é determinada pela maior concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Por outro lado, esta preparação também possibilita determinar a capacidade do RS em liberar íons  $\text{Ca}^{2+}$  mediante a presença de cafeína, um conhecido agonista de RyRs (Vites e Pappano, 1994).

A sensibilidade do aparato contrátil aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser determinada quando utilizamos a Solução A (pCa 4,0). Os resultados nesta solução indicam a capacidade máxima de produção de força em consequência da máxima concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na solução (Lofrano-Alves, M.S., et al., 2005).

Quando as trabéculas atriais foram transferidas para a Solução E acrescida de cafeína (30 mM) pudemos observar o aumento da produção de força, ocorrida como consequência da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos RyRs. Tais resultados, corroboram os encontrados em experimentos com músculo esquelético de crustáceos (Lea, J. T., 1996). Da mesma forma, esses dados nos confirmam a viabilidade da membrana do RS mesmo após a saponificação.

Logo após, a preparação foi transferida para a Solução L objetivando um recarregamento do RS com íons  $\text{Ca}^{2+}$ , a preparação foi transferida desta feita, para a Solução E acrescida de eugenol (5 mM). Os resultados indicam que o eugenol foi capaz de induzir um desenvolvimento de força significativamente superior quando comparada àquela induzida pela cafeína (agonista de RyRs).

Contudo, estudos em células isoladas de músculo esquelético e de músculo cardíaco dos quais o sarcolema foi removido mecanicamente (skinned fibers) possibilitam a investigação dos processos de ativação do sistema contrátil (Gordon, 1978). A remoção do sarcolema permite que soluções contendo íons e substratos banhem diretamente os filamentos contráteis. Dessa forma, os efeitos dos íons e substratos sobre os registros da tensão muscular de fibras desmembranadas pode ser utilizado para avaliar suas interações com as proteínas contráteis (Gordon, 1978). A solubilização da bicamada lipídica por meio de diferentes detergentes não-iônicos tem chamado a atenção, particularmente pelo uso do Triton X-100 (Almgren, 2000). A utilização do Triton X-100 tem sido empregada objetivando a permeabilização tanto da membrana celular (sarcolema) bem como da membrana das organelas. Tal procedimento nos possibilita estudo mais direto sobre as proteínas contráteis (Almgren, 2000).

Após a obtenção da tensão máxima por ação do eugenol, foi adicionado à solução banho Triton X-100 (1% , vol/vol). Nestas condições experimentais, observamos que o eugenol foi incapaz de manter o aumento da tensão de repouso, resultando num relaxamento com tensão de repouso inferior à condição inicial. Tais resultados sugerem que o eugenol não estaria agindo diretamente sobre as proteínas contráteis, como já observado nos experimentos com BDM.

Considerando-se, como visto anteriormente, a possibilidade do eugenol não estar atuando via RyRs, poderíamos hipotetizar que a força desenvolvida foi induzida por uma via independente dos RyRs e de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Tais dados confirmam os encontrados em experimentos com músculo intacto. Entretanto, quando interferirmos sobre o mecanismo de AEC, estaremos interferindo na contração muscular via íons cálcio, como demonstra a literatura especializada. Assim sendo, poderia, o eugenol, estar agindo através ou associado ao cálcio compartimentalizado em uma série de sítios localizados dentro e fora da célula, tais como: cálcio extracelular; cálcio ligado aos sítios aniônicos do glicocálice; cálcio via corrente lenta (DHPRs); cálcio ligado à face interna da membrana; cálcio ligado ao RS; cálcio mioplasmático que atua sobre a troponina; cálcio mitocondrial e cálcio nuclear. O vermelho de rutênio é um composto solúvel em água obtido através da reação em solução de  $\text{RuCl}_3$  e  $\text{NH}_3$  (Joly, 1892). Ele é um composto complexo de elevado peso molecular e, assim, impermeável à membrana (Charuk et al., 1990). Entretanto, o vermelho de rutênio é um composto largamente utilizado em preparações de fibras permeabilizadas por saponina, pois atua como um agente bloqueador de RyRs (Kargacin et al., 1998; Marx et al., 2001). O vermelho de rutênio tem efeito do tipo inibitório em relação ao transporte e liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques mitocondriais (Gunter, T. E., and Pfeiffer, D. R., 1990), é um inibidor dos canais liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS em músculo liso e músculo esquelético (Garcha, R. S., and Hughes A. D., 1994; Kanmura, Y, et al., 1989; Chamberlain, B. K., et al., 1984; Ma, J., 1993; Mack, M.M., et al., 1992); da Bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática (PMCA) (Missiaen et al., 1990) da Bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana do RS (SERCA) (Kanmura et al., 1989); da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{InsP}_3$  (portanto, inibe  $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) (Kanmura et al., 1989; Vites & Pappano, 1994), bem como várias proteínas de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  como a calmodulina (Sasaki et al., 1992) e a calsequestrina (Charuk et al., 1990). Os resultados do eugenol na presença de

vermelho de rutênio sugerem que em trabéculas permeabilizadas por saponina, este óleo essencial foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso estatisticamente igual àquela desenvolvida pelo eugenol na condição controle (eugenol 5 mM). Dessa forma, nossos resultados sugerem que o eugenol está agindo por uma via independente da descrita no processo de CICR. Estes dados corroboram os encontrados tanto nos experimentos com trabéculas atriais intactas como àqueles encontrados nos experimentos com trabéculas atriais permeabilizadas por saponina. Estes dados foram confirmados pelos resultados obtidos no protocolo em que relacionamos a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na solução com a produção de força na ausência e presença de eugenol (5 mM). Nestas condições experimentais foi possível observar que não houve alteração na curva de força quando comparados os resultados na presença e ausência de eugenol, indicando que este composto não atua sensibilizando as proteínas contráteis aos íons Cálcio.

Na técnica de fibra permeabilizada, podemos utilizar soluções com diferentes concentrações de EGTA, um conhecido quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  (Godt & Maughan, 1977). Nestas condições, pudemos observar a completa ausência de resposta contrátil, na presença de cafeína (30 mM) fato esse que confirma que a concentração de 5 mM de EGTA é suficiente para quelar todo o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelo RS via RyRs. Em seguida, após ter passado pela Solução R (relaxante) a preparação foi transferida para outra câmara contendo Solução R (alto EGTA) mais eugenol (5 mM). Tal procedimento nos mostrou que o eugenol foi capaz de induzir o aumento da tensão de repouso mesmo em solução com EGTA (5 mM). Esses resultados demonstram que o eugenol está induzindo aumento da tensão de repouso em trabéculas atriais através de uma via independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediante tais resultados, procedemos, em seguida, a permeabilização dessa mesma preparação com Triton X-100. Assim sendo, obtivemos uma preparação onde seria viável determinar se o composto em estudo (eugenol) estaria ou não atuando diretamente sobre os miofilamentos contráteis. Ao final dessa etapa, podemos observar que o eugenol não foi capaz de induzir aumento na tensão de repouso como observado em protocolos anteriores. Ainda nesse protocolo, a preparação foi transferida novamente para Solução A (pCa 4,0). E nestas condições as trabéculas atriais foram capazes de desenvolver força de

contração sugerindo, que o Triton X-100 não foi capaz de alterar a capacidade de ciclicização dos filamentos contráteis.

Os experimentos em que empregamos a técnica de permeabilização da membrana plasmática por saponina, possibilitam a utilização de agentes agonistas e antagonista da mobilização e/ou liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , impermeáveis a membrana plasmática (Matsubara et al., 1989). Possibilitam, também, a identificação da integralidade da membrana do RS e proteínas associadas, como RyRs, uma vez que observamos o aumento da tensão de repouso na presença de cafeína (Vites e Pappano, 1994). Possibilita ainda utilização de um efetivo quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , o EGTA (Godt & Maughan, 1977), e mesmo nestas condições o eugenol é capaz de aumentar a tensão de repouso. Porém, quando removemos quimicamente a membrana plasmática e membranas das organelas celulares, dentre elas o RS, por ação do Triton X-100 (Almagren, 2000), técnica esta que nos possibilita atuar diretamente nas proteínas contráteis (Gordon, 1978), observamos a reversão da capacidade do eugenol em aumentar a tensão de repouso. Para respondermos a esta questão, realizamos um protocolo em que permeabilizamos as trabéculas atriais com saponina, por 20, 40, 60 e 80 minutos, e ainda utilizamos trabéculas intactas. Os resultados demonstraram que, para obtermos a ativação máxima das proteínas contráteis em solução A, é necessária a permeabilização da membrana plasmática; que a cafeína é capaz de atravessar a membrana plasmática e que a resposta a este composto é aumentada quando a trabécula esta permeabilizada, e como a resposta manteve-se ao longo do tempo, indica que a permeabilização por saponina não tem efeitos sobre a membrana do RS; porém o resultado mais significativo foi que o aumento da tensão de repouso induzida por eugenol, tem decréscimo considerável ao longo do tempo de permeabilização por saponina, chegando a 80 minutos sem resposta alguma. Tais dados são semelhantes ao observados na presença de Triton X-100, e nos indicam que a via pela qual atua o eugenol é solúvel e localizada no citosol.

O 1,4-Ditiotreitól (DTT) é um agente redutor, usado rotineiramente como agente protetor em todos os experimentos com enzimas e proteínas. Estudos realizados em células musculares esqueléticas demonstraram que a ação redox do DTT não ativa a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, e ainda pode efetivamente inibir a despolarização que induz a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  (Posterino & Lamb, 1996). Estudos

demonstraram que o DTT não altera a concentração livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , em células musculares intactas, durante experimentos de tetânia submáxima, e que ainda nestas condições experimentais o DTT resulta numa diminuição da produção de força (Andrade et al., 1998). Em nossos experimentos, após a obtenção da tensão máxima em solução A, e reposta a cafeína em solução E, as trabéculas foram incubadas em solução R acrescida de DTT (100  $\mu\text{M}$ ), por 20 minutos. Após o período de incubação as trabéculas foram transferidas para solução R, acrescida de DTT (100  $\mu\text{M}$ ) e Eugenol (5 mM). Os resultados demonstram que após o tratamento com DTT e na presença de DTT, o eugenol foi capaz de aumentar significativamente a tensão de repouso quando comparada a tensão de repouso desenvolvida por eugenol controle. Tais resultados não podem ser imputados a capacidade do DTT em desenvolver força, uma vez que Andrade et al (1998) já demonstrou não ser possível, desta forma, esta resposta significativamente maior, possivelmente, é resultado da capacidade protetiva deste componente contra a degradação de proteínas, reafirmando que, a via pela qual atua o eugenol é dependente de um agente proteico citoplasmático.

A colchicina é um alcaloide muito tóxico, extraído principalmente de bulbos de plantas da espécie *Colchicum autumnale* pertencente à família *Liliaceae* (Havas, 1937). É também a substância mais empregada para a indução de poliploidia em programas de melhoramento genético de culturas agrícolas, espécies florestais e plantas ornamentais (Sharma & Sharma, 1999; Silva et al., 2000).

O mecanismo de ação da colchicina é conhecido. Ela se liga reversivelmente ao dímero de tubulina, causando mudança conformacional que impede a polimerização do fuso mitótico e, conseqüentemente, bloqueia a célula em metáfase. Como os sítios específicos aos quais a colchicina se liga nos dímeros  $\alpha$  e  $\beta$  são inacessíveis quando a tubulina está polimerizada na forma de microtúbulos, impedindo-a de se polimerizar. Em microtúbulos já formados, a colchicina impede o crescimento destas estruturas durante a divisão celular (Morejohn et al., 1987; Sluder, 1991).

Em concentrações mais baixas, a colchicina promove a despolimerização do fuso mitótico, em função da desorganização dos microtúbulos (Doležel, 1995), quando liga-se com tubulina forma o complexo *colchicina-tubulina*, que

impede a adição de tubulina na extremidade mais (+) do microtúbulo, resultando na desmontagem do microtúbulo (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os microtúbulos são estruturas encontradas no citoplasma e também nos prolongamentos celulares, como cílios e flagelos. São estruturas rígidas e desempenham papel significativo no desenvolvimento e manutenção das células (Junqueira & Carneiro, 2004), porém também estão envolvidos no posicionamento de vesículas envoltas por membrana e organelas, e o transporte de vesículas envoltas por membranas com uma das principais funções (Cooper, 2001). A polimerização da tubulina, durante a formação do microtúbulo (polimerização e despolimerização) depende da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol e da participação das Proteínas Associadas aos Microtúbulos ou MAPs (Junqueira & Carneiro, 2004).

Em nossos experimentos induzimos a despolimerização ou desorganização do microtúbulo por adição de colchicina (30  $\mu\text{M}$ ) a solução banho, permanecendo assim por 20 minutos, tempo suficiente para ação deste composto. Após a incubação, adicionamos a solução eugenol (5 mM), e nestas condições experimentais, o eugenol foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso maior que o observado em eugenol controle. Estes resultados sugerem em conjunto com os observados na presença de DTT, que a via pela qual o eugenol atua é dependente de um agente proteico citosólico solúvel associado aos microtúbulos.

Aparentemente, a ação protetiva do DTT bem como a potencialização observada por ação da colchicina, indicaram que o eugenol atua por uma via citosólica solúvel. Para testar esta hipótese realizamos um protocolo, com o objetivo de analisar a possibilidade de reincorporação deste ou destes agentes solúveis a uma trabécula atrial tratada com Triton X-100. A ausência de resposta em solução E acrescida de cafeína (30 mM) confirmou que a membrana do RS foi dissolvida por ação do Triton X-100. Como em protocolos anteriores, nestas condições experimentais, o eugenol (5 mM) foi incapaz de aumentar a tensão de repouso. Quando a preparação foi transferida para solução experimental denominada de SUCO, esta foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso correspondente a 20% da tensão obtida em eugenol controle. Quando a preparação foi transferida para solução R (SUCO) acrescida de eugenol (5 mM), este foi capaz de induzir aumento da tensão de repouso estatisticamente igual a

tensão em eugenol controle. O mesmo foi observado em solução R (SUCO + COLCH), mesma sem a presença de eugenol, a tensão desenvolvida foi igual a observada em eugenol controle. Porém quando adicionamos eugenol a solução R (SUCO+COLCH) obtivemos maior desenvolvimento de tensão de repouso quando comparado com demais resultados. Em conjunto estes dados indicam que o produto da permeabilização é capaz, por si só, de aumentar a tensão de repouso, que é substancialmente maior na presença de eugenol, quando a permeabilização é realizada na presença de colchicina ocorre uma potencialização no aumento da tensão de repouso na presença e na ausência de eugenol, confirmando o dados anteriores, que o eugenol atua por uma via citosólica, solúvel, através de proteínas que podem estar associadas aos microtúbulos.

Arsenito de sódio ou arsênico trivalente, é uma ferramenta amplamente utilizada para estudar os efeitos da ativação da 38 MAPk em miócitos cardíacos. A ação predominante do arsenito é uma ativação forte e sustentada da p38 MAPk (Chen et al., 2003). Experimentos realizados para identificar a atividade da p38 MAPk em corações intactos, através de uma abordagem transgênica, demonstraram que a ativação aguda desta cinase, resultou, diretamente, numa depressão da capacidade dos miofilamentos em desenvolver força máxima (Vahebi et al., 2007), o mesmo foi observado, em preparações permeabilizadas, ou seja, redução da capacidade máxima de produção de força por miofilamentos, quando da estimulação da p38 MAPk por arsenito (Chen et al. 2003; Vahebi et al., 2007).

Estudos foram realizados com Isoeugenol, eugenol e alibenzeno, para investigar seus possíveis efeitos na sinalização de uma grande variedade de cinases, dentre elas a p38 MAPk. Os resultados demonstram que estes óleos essenciais, dentre eles o eugenol, são capazes inibir a produção de NO (óxido nítrico) e a expressão de iNOS, e que seus efeitos são mediados pela bloqueio da fosforilação (inibição) de ERK 1/2 e p38 MAPk, além da degradação da I- $\kappa$ B $\alpha$ , e ativação de NF- $\kappa$ B (Choi et al., 2007).

Nossos resultados demonstram que, de forma dose dependente, o arsenito (1, 3, 5, 7, e 10 mM) foi capaz de reverter o aumento da tensão de repouso induzida pelo eugenol (5 mM). A curva dose-resposta nos possibilitou determinar qual seria a concentração de arsenito a ser utilizada nos demais

protocolos ( $IC_{50}=6,78$  mM). Mesmo sendo o arsenito, um agente tóxico, experimentos com trabéculas atriais intactas e estimuladas eletricamente, demonstraram que mesmo após a exposição a arsenito (7 mM) houve recuperação da capacidade contrátil (50% quando comparada ao twitch), e após a preparação ser lavada, o eugenol foi capaz de induzir o aumento da tensão de repouso. Em preparações permeabilizadas por saponina, após a obtenção da força máxima em solução A, a trabécula foi incubada com arsenito (7 mM) por 30 minutos, e nestas condições experimentais, o arsenito não foi capaz de alterar a sensibilidade das proteínas contráteis ao  $Ca^{2+}$ , resultado este corroborado pelos dados apresentados por Vahebi et al (2007). Todavia, a capacidade do eugenol em induzir o aumento da tensão de repouso, foi inibida na presença de arsenito (7 mM). Tais resultados repetiram-se quando a preparação foi tratada com Triton X-100, ou seja, não houve alteração na sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  pelas proteínas contráteis, mas novamente, o arsenito foi capaz de inibir a capacidade do eugenol em aumentar a tensão de repouso. Em conjunto estes dados indicam que a via pela qual atua o eugenol, é, possivelmente, em razão de sua capacidade de inibir a atividade da p38 MAPK, como já demonstrado por Choi et al (2007).

Uma das propriedades, do eugenol, descritas na literatura, refere-se a sua capacidade de atuar diretamente ou indiretamente sobre a concentração de ATP livre. Em estudos realizado com fibroblastos foi observado que este óleo foi capaz, nas concentrações de 1 e 2 mM, incubadas por 1 hora, de reduzir em 18% e 46%, respectivamente, a concentração de ATP celular, sugerindo que a capacidade do eugenol, em alterar a concentração livre de ATP, é tempo e concentração dependente (Jeng et al., 1994). Em outro estudo, investigou os possíveis efeitos do eugenol sobre as subunidades F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub> da ATPase de membrana mitocondrial. Os resultados demonstraram que o eugenol foi capaz de estimular a hidrólise de ATP, bem como inibiu a oxidação de NADH, resultando na redução da concentração livre de ATP (Usta et al., 2002). A ativação dos filamentos de miosina induzida pelos filamentos finos, foi estado em miócitos cardíacos isolados, bem como em fibras musculares esqueléticas isoladas, observou-se nestes casos que, o número de pontes cruzadas formadas aumentou gradualmente em resposta a redução, também gradual, da concentração de MgATP em solução, mesmo na ausência de  $Ca^{2+}$ . Os

resultados deste estudo indicaram que a formação das pontes cruzadas, pelo menos na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , resultado de uma ativação cooperativa desencadeada pelo filamento fino, concluindo ainda que na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , a ativação por cooperação é maior em músculo cardíaco do que músculo esquelético (Metzger, 1995; Kad et al., 2005)

De forma muito semelhante com os observados na literatura, em nossos experimentos, o eugenol foi capaz, de forma tempo dependente, de reduzir significativamente a concentração de ATP em extratos de trabéculas atriais. Desta forma, outra das possíveis vias pela qual atua o eugenol, pode estar relacionada a capacidade de óleo em reduzir a concentração livre de ATP, resultando no aumento da tensão de repouso por uma ativação cooperativa dos filamentos finos cardíacos, formando pontes cruzadas em estado de forte ligação.

## CONCLUSÕES

O conjunto de resultados apresentados demonstram que a capacidade do eugenol em induzir aumento da tensão de repouso é independente das vias de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques celulares bem como da mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

O aumento da tensão de repouso induzida pelo eugenol não é consequência de um estado de "*rigor mortis*" uma vez que o BDM foi capaz de reverter esta tensão.

O eugenol não atua diretamente nas proteínas contrateis extraíndo troponina I ou fosforilando diretamente a miosina, uma vez que após permeabilização com Triton X-100, este óleo foi incapaz de induzir aumento da tensão de repouso.

Em preparações permeabilizadas o aumento da tensão de repouso induzida por eugenol é resultado da sua capacidade de inibição da p38 MAPK, já em preparações intactas a indução de aumento da tensão de repouso é resultado de sua capacidade de reduzir a concentração livre de ATP, formando assim pontes cruzadas de forma cooperativa.

Tais resultados tomados em conjunto, demonstram que o eugenol não atua especificamente por uma única via, porém independente da via pela qual atue o resultado é sempre o aumento da tensão de repouso.

Desta forma o uso do eugenol como ferramenta experimental pode nos auxiliar na descrição destas vias que podem estar envolvidas numa grande variedade de alterações da função cardíaca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlijamian MK; Westenbroek RE; Catterall WA. Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina. *Neuron*. 1990; 4: 819–32.
- Aires, MM. *Fisiologia Humana*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 795p.
- Almeida, M.A. Efeitos do eugenol sobre o músculo liso traqueal de cobaia. Fortaleza, 2004. 127p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará.
- Almers, W., Stirling, C. Distribution of transport proteins over animal cell membranes. *J. Memb. Biol*, 1984; 77: 169-186
- Almgren, M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants, *Bioch. et Bioph. Acta*, 2000; 1508:146-163.
- Andrews MAV et al., Ion specific and general ionic effects on contraction of skinned fast-twitch skeletal muscle from the rabbit. *J. of Gen. Phy.*, 1991; 98: 1105-1125.
- Bagni MA, Cecchi G, Colomo F, Garzella P. Effects of 2,3-butanedione monoxime on the crossbridge kinetics in frog single muscle fibres. *J. Muscle. Res. Cell. Motil*. 1992; 13: 516-22.
- Bangalore, R., Mehrke, G., Gingrich, K., Hofmann, F., Kass, R.S. Influence of L-type Ca channel  $\alpha_2/\delta$ -subunit on ionic and gating current in transiently transfected HEK 293 cells. *Am. J. Physiol*, 1996; 270: H1521-H1528.
- Bennett, PB. Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J. Hist. and Cytoch*. 1963; 11: 14.

- Berlin, J.R. Spatiotemporal changes of  $\text{Ca}^{2+}$  during electrically evoked contractions in atrial and ventricular cells. *Am J Physiol*, 1995; 269:H1165-H1170.
- Berridge, M.J.; Irvine, R.F.; Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction *Nature*. Sep 21;341(6239):197-205, 1989.
- Bers, DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002; 45:198-205.
- Bers, DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2<sup>st</sup> ed. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 2001.
- Bers, DM; Stiffel, VM. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *American Journal of Physiology*, 1993; 264: C1587-C1593.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., Ehrlich, B.E.. Bell-shaped calcium-response curves of  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, 1991; 351:751,754.
- Bezprozvanny, I; Ehrlich, BE. The inositol 1, 4, 5-trisphosphate ( $\text{InsP}$ ) receptor. *J Membr Biol*, 1995; 145:205-216.
- Blanchard, EM; Smith, GL; Allen, DG; Alpert, NR; The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillae muscles. *Pflug Arch Eur J*, 1990; 416:219-221.
- Blanchard, EM; Solaro, RJ; Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH. *Circ Res*, 1984; 55:382-391.
- Block, BA; Imagawa, T; Campbell, KP; Franzini-Armstrong, C. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *Journal of Cellular Biology*, 1988; 107: 2587-2600.
- Blondel, O; Takeda, J; Jansen, H; Seino, S and Bell, GI. Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype,  $\text{IP}_3\text{R-3}$ ,

expressed in pancreatic islet, kidney, gastrointestinal tract and other tissues. J Biol Chem, 1993; 268:11356-11363.

Bodi, I; Mikala, G; Koch, SE; Akhter, AS; Schwartz, A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. The Journal of Clinical Investigation, 2005; 115.

Boehning D; Mak DOD; Foskett JK; Joseph SK; Molecular determinants of ion permeation and selectivity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channels. J Biol Chem, 200; 1276: 13509–13512.

Bootman, M.D.; Lipp, P & Berridge, M.J. The organization and functions of local  $\text{Ca}^{2+}$  signals. J Cell Sci, 2001; 114:2213-2222.

Bootman, MD; Collins, TJ; Mackenzie, L; Roderick, HL; Berridge, MJ; Peppiatt, CM;. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry, but an inconsistent inhibitor of InsP3-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release, FASEB J., 2002; 16:1145–1150.

Bradley, K.N; Flynn, E.R.M; Muir, T.C; McCarron, J.G.  $\text{Ca}^{2+}$  regulation in guinea-pig colonic smooth muscle: the role of the  $\text{Na}^{+}$ – $\text{Ca}^{2+}$  exchanger and the sarcoplasmic reticulum. *Journal of Physiology* (2002), 538.2, pp. 465–482

Bremel, RD & Weber, A. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. Biochemistry Biophysics Acta, 1975; 376: 366-374.

Brenner, B. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibres. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1988; 85: 3265-33269.

Brenner, B; Yu, LC; Structural changes in the actomyosin cross-bridges associated with force generation. Proc Natl Acad Sci (USA), 1993; 90:5252-5256.

Bridge, J.H.B., Smolley, J.R., Spitzer, K.W.. Isolation of the sodium-calcium exchange current underlying sodium-dependent relaxation in heart muscle. Science, 1990; 248: 376-378.

- Brilla C; Janicki JS; Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circulation Research*, 1991; 69: 107-115.
- Brodin, P & Roed, A. Effects of eugenol on rat phrenic nerve and phrenic nerve-diaphragm preparations. *Archives of Oral Biology*, 1984; 29(8): 611-615.
- Brown, J.H., Jones, L.G.. Phosphoinositide metabolism in the heart, in *Phosphoinositides and receptor mechanisms*. Putney, J.W. Jr (ed). New York, NY, 1986; 245-270.
- Burgess, G.M., Bird, G.S., Obie, J.F., Putney, J.W Jr.. The mechanism for synergism between phospholipase. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 4772-4781.
- Cameron, AM; Steiner, JP; Sabatini, DM; Kaplin, AL; Walensky, LD; Snyder, SH. Immunophilin FK506 protein associated with inositol 1,4,5-triphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92:1784-1788.
- Carl, S.L.; Felix, K.; Caswell, A.H.; Brandt, N.R.; Ball, W.J.Jr; Vaghy, P.L.; Meissner, G. & Ferguson, D.G. Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticulum triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J Cell Biol*, 1995; 129:672-682.
- Caroni P & Carafoli, E. An ATP-dependent  $Ca^{2+}$ -pumping system in dog heart sarcolemma. *Nature*, 1980; 283: 765-767.
- Chadwick, CC; Saito, A and Fleischer, S. Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87:2132-2136.
- Chamberlain BK, Volpe P, Fleischer S. Inhibition of calcium-induced calcium release from purified cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem*, 1984; 259:7547-7553

- Chamberlain, BK; Volpe, P; Fleischer S. Inhibition of calcium-induced calcium release from purified cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem*, 1984; 259:7547–7553.
- Chapman, RA. Control of cardiac contractility at the cellular level. *American Journal of Physiology. Heart Circ Physiol*, 1983; 14: H535-H552.
- Charuk, JHM; Pirraglia, CA; Reithemeier, RAF. Interaction of ruthenium red with  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins. *Analytical Biochemis*, 1990; 188:123-131.
- Chen, Y; Ravi, R; Qinghang, L; e Polly, H; Acute p38 MAPK activation decreases force development in ventricular myocytes. *Am. Journal Physiology Heart*, 285: H2578-H2586, 2003
- Cheng HP, Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol. Rev.* 2008; 88: 1491-545.
- Cheng HP, Wang SQ. Calcium signaling between sarcolemmal calcium channels and ryanodine receptors in heart cells. *Front. Biosci.* 2002; 7: D1867-D1878.
- Cheng, H; Lederer, WJ; Cannell, MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitatio-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 1993; 262: 740-744.
- Choi, C,Y; Park, Kyung-Ran; Lee, Jung-Hee; Jeon, Y.J.; Liu, K.H.; Oh, S.; Kim, D.E.; Yea, S.S.; Isoeugenol suppression of inducible nitric oxide synthase expression is mediated by down-regulation of NF- $\kappa$ B, ERK  $\frac{1}{2}$ , and p38 Kinase. *European Journal of Pharmacology*, 576; 151-159; 2007.
- Cingolani, HE; Houssay, AB. *Fisiologia Humana de Houssay*. 7<sup>a</sup>. edição. São Paulo: editora Artmed, 2004.
- Clapham, DE. Calcium signaling. *Cell*, 1995; 80: 259-268.
- Clifford MN. Miscellaneous phenols in foods and beverages - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food. Agric.* 2000; 80: 1126-37.

- Constantin, LL & Podolsky, RJ. Apud Fabiato, A & Fabiato, F. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res*, 1977; 40: 119-129.
- Cooper, G. M. *A Célula: uma abordagem molecular*. Editora Artimed, 2ª edição: 2001.
- Corbalan-Garcia, S.; Teruel, A; Gomez-Fernandez, J.C. Characterization of Ruthenium Red-binding sites of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from sarcoplasmic reticulum and their interaction with Ca<sup>2+</sup>-Binding sites. *Murcia: J. Biochem*, 1992; 287, 767-774
- Craveiro, AA; Rodrigues, AS; Andrade, CHS. Volatile constituents of brazilian Euphorbiaceae genus Croton. *J Nat Prod*, 1981; 44(5): 509-632.
- Curry, FE. Determinants of capillary permeability: a review of mechanisms based on single capillary studies in the frog. *Circ Res*, 1986; 59: 367-380.
- Daly, MJ; Elz, JS; Nayler, WG. Contracture and the calcium paradox in the rat heart. *Circ Res*, 1987; 61:560-569.
- Damiani CEN, Moreira CM, Zhang HT, Creazzo TL, Vassallo DV. Effects of eugenol, an essential oil, on the mechanical and electrical activities of cardiac muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2004; 44: 688-95.
- Damiani, CEN; Moreira, CM; Zhang, HT; Creazzo, TL and Vassallo, DV. Effects of eugenol, an essential oil, on the mechanical and electrical activities of cardiac muscle. *J Card Pharmacol*, 2004; 44:688-695.
- De Jongh, KS; Merrick, DK; Catterall, WA. Subunits of purified calcium channels. A 212-kDa form of  $\alpha_1$  and partial amino acid sequence of a phosphorylation site of an independent  $\beta$  subunit. *Proce of the Nat Acad of Sci, USA*, 1989; 86: 8585-8589.
- De Waard, LJ; Pragnell, M; Campbell, KP. Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved  $\beta$  subunit domain. *Neuron*, 1994; 13:495-503.

- Del Nido, PJ; Glynn, P; Buenaventura, P; Salama, G; Koretsky, AP. Fluorescence measurement of calcium transients in perfused rabbit heart using rhod 2. The Am Physiol Society, 1998; 43:728-741.
- Del Valle-Rodriguez, A; Lopez-Barneo, J; Urena, J. Ca<sup>2+</sup> channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca<sup>2+</sup> influx. EMBO J., 2003; 22:1–9.
- Dip, E.C; Pereira, N.A; Fernandes, P.D.C. Ability of eugenol to reduce tongue edema induced by *Dieffenbachia picta* Schott in mice. Toxic. v. 43, p. 729-735, 2004.
- Doležel, J. Doleželová, M.; Novak, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). Biologia Plantarum, Dordrecht, v. 36, p. 351-357, 1994.
- Ducke, A. Estudos botânicos no Ceará. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 1959; 31: 231.
- Dulhunty AF. Excitation–contraction coupling from the 1950s into the new millennium. Clin and Exp Pharmacol and Physiol, 2006; 33, 763–772.
- Elison, C.; Jenden, D.J. Effects of Ryanodine on Model Systems Derived from Muscle. Bioch Pharmacol, 1967; 16:1339.
- Endo, M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol Rev, 1977; 57: 71-108.
- Endo, M. Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Proc. Jpn. Acad, 1975; 51, 479–484.
- Endoh, M. Cardiac  $\alpha_1$ -adrenoceptors that regulate contractile function: Subtypes and subcellular signal transduction mechanisms. Neuroch Res, 1996; 21: 217-229.
- Ertl, R; Jahnel, U; Nawrath, H; Carmeliet, E; Vereecke, J; Differential electrophysiologic and inotropic effects of phenylephrine in atrial and

ventricular heart muscle preparations from rats. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 1991; 344:574-581.

Escobar, R. G. Eugenol: Propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Ver Cubana Estomatol*, v. 39, 2002.

Fabiato, A & Fabiato, F. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J of Physiol*, 1983; 245: c14.

Fabiato, A. & Fabiato, F. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol, London*, 1975; 249: 469-495.

Fabiato, A. Comparison and relation between inositol (1, 4, 5)-trisphosphate-induced release and calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum, in *Recent Advances in Calcium Channels and Calcium Antagonists*. Yamada K; Shibata S (eds). Elmsford, NY, Pergamon Press, Inc. 1990; 35-39.

Fabiato, A. Dependence of the  $Ca^{2+}$ -induced release from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres from the frog semitendinosus on the rate of change of free  $Ca^{2+}$  concentration at the outer surface of the sarcoplasmic reticulum. *J Physiol*, 1984; 353-56.

Fabiato, A. Inositol (1, 4, 5)-trisphosphate-induced release of  $Ca^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. *Biophys J*, 1986a; 49:190a.

Fabiato, A. Inositol (1, 4, 5)-trisphosphate-induced versus  $Ca^{2+}$  from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Int Union Physiol Sci*, 1986b; 16:350.

Fabiato, A. Rapid ionic modifications during the aequorin-detected calcium transient in a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol*, 1985; 85:189-246.

Fabiato, A & Fabiato, F. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum *Circ Res*, 1977; 40: 119-129.

- Fairhurst, A.S. Effect of Ryanodine on Skeletal-Muscle Reticulum Calcium Adenosine-Triphosphatase. *Bioch Pharmacol*, 1973; 22:2815-2827.
- Farah, C.S.; Reinach, F.C. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB. J.*, 1995; 9:755–767.
- Ferrier, G.R.; Howlett, S.E. Cardiac excitation-contraction coupling: role of membrane potential in regulation of contraction. *American Journal of Physiology-Heart and Circ Physiol*, 2001; 280:H1928-H1944.
- Flicker, P.F.; Phillips G.N. Jr; Cohen, C. Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J Mol Biol*, 1982; 162: 495-501.
- Ford, L.E. Mechanical Manifestations of Activation in Cardiac-Muscle. *Circ Res*, 1991; 68:621-637.
- Francisco H. Andrade, F.H; Reid, M.B; Allen, D.G; Westerblad, H.A. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *Journal of Physiology* (1998), 509.2, pp. 565—575 565
- Franzini-Armstrong, C. Membrane particles and transmission at the triad. *Fed Proc*, 1975; 34: 1382-1389.
- Franzini-Armstrong, C. Studies of the triad. Structure of the junction in frog twitch fibres. *J Cell Biol*, 1970; 47: 488-499.
- Franzini-Armstrong, C; Protasi, F. Ryanodine receptors of striated muscles: A complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev*, 1997; 77: 699-729.
- Freiburg, A; Gautel, M. A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. J. Biochem*, 1996; 235:317-323.

- Fryer, MW; Neering, IR; Stephenson, DG. Effects of 2,3-butanedione monoxime on the contractile activation properties of fast- and slow-twitch rat muscle fibres. *J. Physiol*, 1988; 407:53–75.
- Fuchs, F. The binding of calcium to glycerinated muscle fibers in rigor. The effect of filament overlap. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1977; 491:523–531.
- Furuichi, T; Yoshikawa, S; Miyawaki, A; Wada, K; Maeda, N and Mikoshiba, K. Primary structure and functional expression of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature*, 1989; 342:32-38.
- Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF & Pessah IN. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron*, 1997; 19:723–733.
- Galvan, DL; Borrego-Diaz, E; Perez, PJ; Mignery, GA;. Subunit oligomerization, and topology of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *J. Biol. Chem*, 1999; 274:29483-29492.
- Gambassi, G., Spurgeon, H. A., Ziman, B. D., Lakatta, E. G. & Capogrossi, M. C. Opposing effects of  $\alpha$ 1-adrenergic receptor subtypes on  $\text{Ca}^{2+}$  and pH homeostasis in rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol*, 1998; 274, H1152–H1162.
- Garcha RS; Hughes AD. Action of heparin and ruthenium red on responses of reversibly-permeabilized rat mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol*, 1994; 268:319–325.
- Gautel, M; Goulding, D; A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. *FEBS Lett*, 1996; 385:11-14.
- Go, LO; Moschella, MC; Watras, J; Handa, KK; Fyfe, BS and Marks, AR. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest*, 1995; 95:888-894.

- Godt RE & Lindley BD. Influence of temperature upon contractile activation and isometric force production in mechanically skinned muscle fibers of the frog. *J Gen Physiol*, 1982; 80: 279-297.
- Godt RE; Fogaça RTH et al., Changes in force and calcium sensitivity in the developing avian heart. *Can J Physiol and Pharmacol*, 1991; 69: 1692-1697.
- Godt, RE; Maughan, DW. Influence of osmotic compression on calcium activation and tension in skinned muscle fibers of the rabbit. *Pflug. Arch.*, 1981; 391:334-337.
- Godt, RE; Maughan, DW. Swelling of skinned muscle fibers of the frog, experimental observations. *Biophys. J.*, 1977; 19:103-116.
- Gordon, AM; Huxley, AF; Julian, FJ. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol*, 1966; 184: 170-192.
- Gordon, AR. Contraction of Detergent-treated smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1978; 75:3527-3530.
- Gregory, RB; Rychkov, G; Barritt, GJ; Evidence that 2-aminoethoxydiphenyl borate is a novel inhibitor of store-operated  $Ca^{2+}$  channels in liver cells, and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors, *Biochem. J.*, 2001; 354:285–290.
- Grynkiewicz, G; Poenie, M; Tsien, RY. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985; 260:3440-3450.
- Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, 1990; 258:C755–C786
- Györk, S; Fill, M. Ryanodine receptor adaptation: Control mechanism of  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in heart. *Science*, 1993; 260:807-809.
- Hackett, PH; Rodriguez, G; Roach, RC. Clove cigarettes and high-altitude pulmonary edema. [Letter] *JAMA*, 1985; 253: 3551-3552.

- Hagan, EC; Jenner, PM; Jones, WI. Toxic properties of compounds related to safrole. *Toxicol and Appl Pharmacol*, 1965; 7: 18-24.
- Hagar, RE; Ehrkucg, BE; Regulation of the type III  $\text{InsP}_3$  receptor by  $\text{InsP}_3$  and ATP. *Biophys J.*, 2000; 79:271-278.
- Han H-M, Robinson RB, Bilezikian JP & Steinberg SF. Developmental changes in guanine nucleotide regulatory proteins in the rat myocardial  $\alpha_1$ -adrenergic receptor complex. *Circulation Res*, 1989; 65:1763–1773.
- Hancock, WO; Martyn, DA; Huntsman, LL.  $\text{Ca}^{2+}$  and segment length dependence of isometric force kinetics in intact ferret cardiac muscle. *Circulation Res*, 1993; 603-611.
- Hartmann, HA; Mazzocca, NJ; Kleiman RB; Houser, SR. Effects of phenylephrine on calcium current and contractility of feline ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 1988; 255: H1173-H1180.
- Havas, L. Effects of colchicine and “vascum album” preparationa on germination of seeds and growth of seedlings. *Nature*, London, v. 139, n. 3513, p. 371-372, 1937.
- Herrmann, C.; Wray, J.; Travers, F. & Barman, T. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPase. An exemple of an uncompetitive inhibitor. *Biochem*, 1992; 31, 12227-12232,.
- Hescheler, J; Nawrath, H; Tang, M; Tratwein, W. Adrenoceptor-mediated changes of excitation and contraction in ventricular heart muscle from guinea-pigs and rabbits. *J Physiol*, 1988; 397: 657-670.
- Higuchi, H. & Takemori, S. Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *The J Biochem*, 1989; 105, 638-643.
- Hirata, M; Suematsu, E; Hashimoto, T; Hamachi, T and Koga, T; Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from non-mitochondrial store in peritoneal macrophages treated with saponin by inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Biochem J*, 1984; 223:229-236.

- Hirs, A. Sales of clove cigarettes in US: health questions emerge. *Tabacco International*, 1984; 28: 57-58.
- Holroyde, MJ; Robertson, SP; Johnson, JD et al., The calcium and magnesium binding sites on cardiac troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphate. *J Biol Chem*, 1980; 255: 11668-11693.
- Horowitz, A; Menice, CB; Laporte, R and Morgan, K. Mechanism of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*, 1996; 76:967-1003.
- Hui, C. S. Pharmacological studies of charge movement in frog skeletal muscle. *J Physiol*, 1983; 337:509-529.
- Hume, W. R. Effect of eugenol on constrictor responses in blood vessels of the rabbit ear. *J. Dent. Res.*, v. 62(9), p. 1013-5, 1983.
- Hüser J; Lipsius SL & Blatter LA. Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J Physiol*, 1996; 494:641-651.
- INTERNATIONAL CARNIVOROUS PLANT SOCIETY (ICPS). Disponível em: <<http://www.carnivorousplants.org/howto/Propagation/Colchicine.php>>. Acesso em: 10 de março de 2012.
- Inui, M; Saito, A; Fleischer S. Purification of the ryanodine receptor and identity with feet tructures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J Biol Chemi*, 1987a; 262: 1740-1747.
- Inui, M; Saito, A; Fleischer, S. Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem*, 1987b; 262: 15637-15642.
- Ivanov, S.V., et al. Cerebellar ataxia, seizures, premature death, and cardiac abnormalities in mice with targeted disruption of the *Cacna2d2* gene. *Am. J. Pathol*, 2004; 165:1007–1018.

- Jahnel U, Duwe E, Pfennigsdorf S & Nawrath H. On the mechanism of action of phenylephrine in rat atrial heart muscle. *Naunyn Schmeidebergs Arch Pharmacol*, 1994; 349:408–415.
- Jahnel U, Jakob H & Nawrath H. Electrophysiologic and inotropic effects of alpha-adrenoceptor stimulation in human isolated atrial heart muscle. *Naunyn Schmeidebergs Arch Pharmacol*, 1992a; 346:82–87.
- Jahnel U, Nawrath H, Carmeliet E & Vereecke J. Depolarization-induced influx of sodium in response to phenylephrine in rat atrial heart muscle. *J Physiol*. 1991; 432:621–637.
- Jahnel U, Nawrath H, Shieh RC, Sharma VK, Williford DJ & Sheu SS. Modulation of cytosolic free calcium concentration by alpha 1-adrenoceptors in rat atrial cells. *Naunyn Schmeidebergs Arch Pharmacol*. 1992b; 346:88–93.
- Jenden, DJ; Fairhurst, AS; The pharmacology of ryanodine. *Pharmacol Rev*, 1969; 21:1-25.
- Jeng, L.J. Hahn, F.J. Lu, Y.J. Wang, and M.Y.P. Kuo. Eugenol Triggers Different Pathobiological Effects on Human Oral Mucosal Fibroblasts<sup>1</sup>. *J Dent Res*. 1994; 73(5): 1050-1055.
- Joly, A. Composé's ammoniacaux de'rive's du sesquichlorure de ruthe' nium. *C R Acad Sci*, 1892; 115:1299–1301.
- Jonas, S., Sugimori, M., and Llinas, R. Is low molecular weight heparin a neuroprotectant? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1997; 825:389–393
- Junqueira, L.C; Carneiro, J. *Histologia Básica*. Editora Guanabara Koogan, 10<sup>a</sup> edição: 2004.
- Kad NM, Kim S, Warshaw DM, VanBuren P, Baker JE. Single-myosin crossbridge interactions with actin filaments regulated by troponin-tropomyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2005; 102: 16990-5.

- Kagawa, K; Horiuti, K; Yamada, K. BDM compared with P(i) and low Ca<sup>2+</sup> in the cross-bridge reaction initiated by flash photolysis of caged ATP. *Biophys. J*, 1995; 69:2590–2600.
- Kanmura Y; Raeymaekers L; Casteels R. Effects of doxorubicin and ruthenium red on intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in skinned rabbit mesenteric smooth-muscle fibers. *Cell Calcium*, 1989; 10:433–439.
- Kargacin, G.J.; Ali, Z; Kargacin, M.E. (1998). Ruthenium red reduces the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of Ca<sup>2+</sup> uptake into cardiac sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* (1998) 436:338–342
- Katz, AM. A growth of ideas: Role of calcium as activator of cardiac contraction. *Card Res*, 2001; 52:8-13
- Katz, AM. Molecular basis of calcium channel blockade. *Am J Cardiol*, 1992; 69: 17E-22E.
- Katz, AM. Purification and properties of tropomyosin-containing protein fraction that sensitizes reconstituted actomyosin to calcium-binding agents. *J Biol Chem*, 1966b; 241: 1522-1529.
- Katz, AM. Role of the contractile proteins and sarcoplasmic reticulum in the response of the heart to catecholamine: a historical review. *Adv Cyclic Nucleot Res*, 1979; 11: 303-343.
- Katz, AM; Repke, DI; Cohen, B. Control of the activity of highly purified cardiac actomyosin by Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup>. *Circ Res*, 1966a; 19: 1062-1070.
- Katz, AM; Takenaka, H and Watras, J. The sarcoplasmic reticulum, in *The heart and Cardiovascular System*. Fozzard HA (ed). New York, NY, Raven Press, 1986; 731-746.
- Kentish, JC; Barsotti, RJ; Lea, TJ; Mulligan, IP; Patel, JR and Ferenczi, MA. Calcium release from sarcoplasmic reticulum induced by photorelease of calcium or Ins(1, 4, 5)P<sub>3</sub>. *Am J physiol*, 1990; 258:H610-H615.

- Keung EC & Karlner JS. Complex regulation of calcium current in cardiac cells; dependence on a pertussis toxinsensitive substrate, adenosine triphosphate, and a  $\alpha 1$ -adrenoceptor. *J Clin Invest*, 1990; 85:950–954.
- Kirsch, CM; Yenokida, GG; Jensen, WA; Wendland, R; Suh, H; Bourgault, M. Non-cardiogenic pulmonary edema due to the intravenous administration of clove oil. *Thorax*, 1990; 45: 235-236.
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1988; 153, 625–631.
- Kockskamper, J.; Sheehan, K.A.; Bare, D.J.; Lipsius, S.L.; Mignery, G.A.; Blatter, L.A. Activation and propagation of  $Ca^{2+}$  release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Biophys J*, 2001; 81:2590-2605.
- Komai H, Rusy BF. Effects of inhibition of trans-sarcolemmal calcium influx by nickel on force of postrest contraction and on contracture induced by rapid cool. *Cardiovasc Res*, 1993; 27:801–806.
- Kozam, G & Mantell, GM. The effect of eugenol on oral mucous membrane. *Journal of Dental Research*, 1978; 57: 954-957.
- Lahlou, S; Caldas Magalhães, P.J; Leal-Cardoso, J.H; Duarte, G.P. Cardiovascular Effects of Eugenol, a Phenolic Compound Present in Many Plant Essential Oils, in Normotensive Rats. *J. of Cardio. Pharmac.* v. 43(2) p. 250-257, 2004.
- Lai, FA; Erickson, HF; Rousseau, E; Liu, QY; Meeissner, G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from frog skeletal muscle. *Nature*, 1988; 331: 315-319.
- Lamb, GD; Posterino, GS and Stephenson, DG. Effects of heparin on excitation-contraction coupling in skeletal-muscle of toad and rat. *J Physiol*, 1994; 474:319-329.

- Launikonis, B.S.; Stephenson, D.G. Effect of saponin treatment on the sarcoplasmic reticulum of rat, cane toad and crustacean (yabby) skeletal muscle. *Journal of Physiology-London*, 1997; 504:425-437.
- Lavabre, M. *Aromaterapia: A cura pelos óleos essenciais*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Record, 1997.
- Lavoie, E.J.; Adams, J.D.; Reinhardt, J.; Rivenson, A.; Hoffmann, D. Toxicity Studies on Clove Cigarette-Smoke and Constituents of Clove - Determination of the Ld50 of Eugenol by Intratracheal Instillation in Rats and Hamsters. *Archives of Toxicology*, 1986; 59:78-81.
- Lea, T.J. Caffeine and micromolar  $Ca^{2+}$  concentrations can release  $Ca^{2+}$  from ryanodine-sensitive stores in crab and lobster striated muscle fibres. *Journal of Experimental Biology*, 1996; 199:2419-2428.
- Leal-Cardoso, JH; Coelho-de-Souza, AN; Souza, IT; Figueiredo, IM. Effects of eugenol on excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 1994; 327(1): 113-124.
- Lehrer, SS; Golitsina, NL; Geeves, MA. Actin-tropomyosin activation of myosin subfragment-1 ATPase and thin filament cooperativity. The role of tropomyosin flexibility and end-to-end interactions. *Biochemistry*, 1997; 36: 13449-13454.
- Li K, He H, Li C, Sirois P & Rouleau JL. Myocardial  $\alpha_1$ -adrenoceptor: inotropic effect and physiologic and pathologic implications. *Life Sc*, 1997; 60:1305–1318.
- Li, L; DeSantiago, J; Chu, G; Kranias, EG; Bers, DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in  $\beta$ -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *American Journal of Physiology*, 2000; 278: H769-H779.
- Li, T.; Sperelakis, N.; Teinck, R. E.; & Solaro, J. R. Effects of diacetyl monoxime on cardiac excitation-contraction coupling. *J.Pharmacol. Exp. Ther*, 1984; 232, 688-695.

- Lipp, P; Hüser, J; Pott, L. & Niggli, E. Spatially non-uniform  $\text{Ca}^{2+}$  signals induced by reduction of transverse tubules in citrate-loaded guinea-pig ventricular myocytes in culture. *J. Physiol*, 1996a; 497:589-597.
- Lipp, P; Hüser, J; Pott, L. & Niggli, E. Subcellular properties of triggered  $\text{Ca}^{2+}$  waves in isolated citrate-loaded guinea-pig atrial myocytes characterized by ratiometric confocal microscopy. *J Physiol*, 1996b; 497:599-610.
- Lipp, P; Laine, M; Tovey, SC; Burrell, KM; Berridge, MJ; Li, W and Bootman, MD. Functional  $\text{InsP}_3$  receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Current Biology*, 2000; 10:939-942.
- Lipp, P; Pott, L; Callewaert, G & Carmeliet, E. Simultaneous recording of Indo-1 fluorescence and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange current reveals two components of  $\text{Ca}^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum of cardiac atrial myocytes. *FEBS Lett*, 1990; 275:181-184.
- Lofrano-Alves, MS; Oliveira, EL; Damiani, CEN; Kassouf-Silva, I and Fogaça, RTH; Eugenol-induced contractions of saponin-skinned fibers are inhibited by heparin or by a ryanodine receptor blocker. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2005; 83:1-8.
- Lorell, BH; Apstein, CS; Cunningham, MJ; Schoen, FJ; Weiberg, EO; Peeters, GA; Barry, WH. Contribution of endothelial cells to calcium-dependent fluorescence transients in rabbit hearts loaded with indo-1. *Circ. Res*, 1990; 67:415-425.
- Ma J. Block by ruthenium red of the ryanodine-activated calcium release channel of skeletal muscle. *J Gen Physiol*, 1993; 102:1031–1056.
- Mack MM; Zimányi I; Pessah IN. Discrimination of multiple binding sites for antagonists of the calcium release channel complex of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992; 262:1028–1037.
- Mackenzie L; Bootman MD; Laine M; Berridge MJ; Thuring J; Holmes A; Li WH; Lipp P. The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling

and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *J Physiol*, 2002; 541: 395–409.

Mackenzie, L.; Roderick, H.L.; Berridge, M.J.; Conway, S.J. & Bootman, M.D. The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signaling modulates contraction. *J Cell Sci*, 2004; 117:6327-6337.

MacMillan, D; Chalmers, S; Muir, TC; McCarron, JG. IP<sub>3</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> increases do not involve the ryanodina receptor, but ryanodina receptor antagonists reduce IP<sub>3</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> increases in guinea-pig colonic smooth muscle cells. *J. Physiol*; 2005; 569.2:533-544.

Magyar J, Szentandrassy N, Banyasz T, Fulop L, Varro A, Nanasi PP. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 487: 29-36.

Maranto AR. Primary structure, ligand binding, localization of the human type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expressed in intestinal epithelium. *J Biol Chem*, 1994; 269: 1222–1230.

Marchant, J.S. & Parker, I. Functional interactions in Ca<sup>2+</sup> signaling over different time and distance scales. *J Gen Physiol*, 2000; 116:691-696.

Maruyama, T; Kamaji, T; Nakada, S; Kanno, T; Mikoshiba, K; 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Biochem*, 1997; 5005:498-505.

Marx, SO; Gaburjakova, J; Gaburjakova, M; Henrikson, C; Ondrias, K; Marks, AR. Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ Res*, 2001; 88:1151–1158.

Matsubara,I.; Maughan,D.W.; Saeki,Y.; Yagi,N. Cross-Bridge Movement in Rat Cardiac-Muscle As A Function of Calcium-Concentration. *Journal of Physiology-London*, 1989; 417:555-565.

Maylie, J; Hui, CS; Action of 2,3-butanedione monoxime on calcium signals in frog cut twitch fibers containing Anipyrylazo-III. *J Physiol*, 1991; 442:551-567.

- Meissner, G. Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochemistry, Biophysics Acta*, 1975; 389: 51-68.
- Meissner, G. Ryanodine activation and inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 1986; 261 (14): 6300-6306.
- Metzger JM. Myosin binding-induced cooperative activation of the thin filament in cardiac myocytes and skeletal-muscle fibers. *Biophys. J.* 1995; 68: 1430-42.
- Michailescu P, Kouassi M, El Briak H, Armynot A, Boudeville P. Antimicrobial activity and tightness of a DCPD-CaO-based hydraulic calcium phosphate cement for root canal filling. *J. of Biom. Mat. Res. Part B-Applied Biomaterials* 2005; 74B: 760-7.
- Michikawa, T; Hamanaka, H; Otsu, H; Yamamoto, A; Miyawaki, A; Furuichi, T; Tashiro, Y; Mikoshiba, K; Transmembrane topology and sites of N-glycosylation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *J. Biol. Chem*, 1994; 269:9184-9189.
- Mignery, GA; Südhof, TC; Takei, K and Camilli, P. Putative receptor for inositol 1, 4, 5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature*, 1989; 342:192-195.
- Mignery, GA; Südhof, TC; The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5,-triphosphate receptor. *EMBO J.*, 1990; 9:3893-3898.
- Minamikawa, T., Cody, S., & Williams, D. In situ visualization of spontaneous calcium waves within perfused whole rat heart by confocal imaging. *Am J Physiol*, 1997; 272:H236–H243.
- Missiaen, L.; Callewaert, G.; De Smedt, H.; and Parys, J. B. 2-aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pump and the non-specific leak from the non-mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  stores in permeabilised A7r5 cells. *Cell Calcium*, 2001; 29:111–116

- Missiaen, L; Callewaert, G; De Smedt, H; Parys, JB;. 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol, 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pump and the non-specific leak from the non-mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  stores in permeabilised A7r5 cells, *Cell Calcium*, 2001; 29:111–116.
- Moore, ED; Voigt, T; Kobayashi, YM; Isenberg, G; Fay, FS; Gallitelli, MF; Franzini-Armstrong, C. Organization of  $\text{Ca}^{2+}$  release units in excitable smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *Biophysical Journal*, 2004; 87:1836-1847.
- Moraru II; Kaftan EJ; Ehrlich BE; Watras J; Regulation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium channels by  $\text{InsP}_3$  and calcium: simulation of single channel kinetics based on ligand binding and electrophysiological analysis. *J Gen Physiol*, 1999; 113: 837–849.
- Morejohn, L. C.; Bureau, T. E.; Bajer, M.; Bager, A. S.; Fosket, D. E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta*, Berlin, v. 172, n. 2, p. 252-264, 1987.
- Morris SA; Nerou EP; Riley AM; Potter BV; Taylor CW; Determinants of adenophostin A binding to inositol trisphosphate receptors. *Biochem J* 367: 113–120.
- Moschella, M.C.; Marks, A.R.. Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Expression in Cardiac Myocytes. *Journal of Cell Biology*, 1993; 120:1137-1146
- Mulieri, LA; Alpert, NR. Differential effects of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on activation and contraction. *Biophys.*, 1984; 45-47.
- Nishijima, H; Uchida, R; Kawakami, N; Shimamura, K; Kitamura, K. Role of endothelium and adventitia on eugenol-induced relaxation of rabbit ear artery precontracted by histamine. *Journal of Smooth Muscle Research*, 1998; 34: 123-137.
- Nishijima, H; Uchida, R; Kameyama, K; Kawakami, N; Ohkubo, T; Kitamura, K. Mechanisms mediating the vasorelaxation of eugenol, a pungent oil, on

rabbit arterial tissue. *Jpn. J. Pharmacol*, v. 79, p. 327-334. *Nature* 312, 315 – 321, 1999.

Nomura, N; Satoh, H; Terada, H; Hayashi, H. CAM II is responsible for reactivation of SR Ca uptake and contractile recovery during intracellular acidosis. *Journal of Molecular Cell Cardiology*, 2000; 32: A98.

Nosek, TM; Willians, MF; Ziegler, ST and Godt, RE. Inositol trisphosphates enhances calcium release in skinned cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1986; 250:C807-C811.

O'Neill, SC; Miller, L; Hinch, R; Eisner, DA. Interplay between SERCA and sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> efflux pathways controls spontaneous release of Ca<sup>2+</sup> from the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 2004; 559.1:121-12.

Obermann, WM; Plessmann, U; Weber, K; Furst, DO. Purification and biochemical characterization of myomesin, a myosin-binding and titin-binding protein from bovine skeletal muscle. *European Journal of Biochemistry*, 1995; 233: 110-115.

Offer, G. C-protein and periodicity in the thick filaments of vertebrate skeletal muscle. *Cold Spring Harbor Symposium Quant Biol*, 1972; 37: 87-93.

Ogawa, Y. Role of ryanodine receptors. *Crit Rew Biochem Mol Biol*. 1994; 29:229-274.

Ohkubo, T & Kitamura, K. Eugenol activates Ca<sup>2+</sup>-permeable currents in rat dorsal root ganglion cells. *Journal of Dental Research*, 1997; 76(11): 1737-1744.

Ohtsuki, I. Molecular arrangement of troponin T in the thin filament. *Journal of Biochemistry*, 1979; 86: 491-497.

Olivoto, R.R. Efeitos do eugenol, sobre o processo de acoplamento excitação- contração (AEC) de músculo cardíaco de rato: envolvimento da via receptor IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R). Curitiba, 2008. 150 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular

e Molecular – área Fisiologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Opie, LH. Regulation of myocardial contractility. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1995; 26: S1-S9.

Ostwald, TJ & MacLennan, DH. Isolation of high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 1974; 249: 974-979.

Ozeki, M. The effects of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1975; 50C: 183-191.

Page, E. Quantitative ultrastructural analysis in cardiac membrane physiology. *American Journal of Physiology*, 1978; 235: C147-C158.

Page, E; McCallister, LP; Power, B. Stereological measurements of cardiac ultrastructures implicated in excitation-contraction-coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1971; 68: 1465-1466.

Peppiatt, MC; Collins, TJ; Mackenzie, L; Conway, SJ; Holmes, AB; Bootman, MD; Berridge, MJ; Seo, JT; Roderick, HL;. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium*, 2003; 97-108.

Perez DM, DeYoung MB & Graham RM. Coupling of expressed  $\alpha 1B$ - and  $\alpha 1D$ -adrenergic receptors to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol Pharmacol*, 1993; 44:784–795.

Perez, PJ; Ramos-Franco, J; Fill, M and Mignery, G. Identification and functional reconstitution of the type 2 Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997; 19:23961-23969.

Perez-Reyes, E & Schneider, T. Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int*, 1995; 48: 1111-1124.

- Pessoa, L.M; Morais, S.M; Bevilaqua, C.M.L; Luciano, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. And Eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterin. Parasit.* v. 109, p. 59-63, 2002.
- Piacentino, V. III, Dipla, K., Gaughan, J. P. & Houser, S. R. Voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  release from the SR of feline ventricular myocytes is explained by  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. *J. Physiol*, 2000; 523, 533–548
- Poggioli, J., Sulpice, J. C. & Vassort, G. Inositol phosphate production following  $\alpha$ 1-adrenergic, muscarinic, or electrical stimulation in isolated rat heart. *FEBS Lett*, 1986; 206, 292–298.
- Pogwizd, SM.; Schlotthauer, K; Li, L; Yuan, W & Bers, DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium–calcium exchange, inward rectifier potassium current and residual  $\beta$ -adrenergic responsiveness. *Circ. Re*, 2001; 88, 1159–1167.
- Posterino, G. S. & Lamb, G. D. Effects of reducing agents and oxidants on excitation—contraction coupling in skeletal muscle fibres of rat and toad. *Journal of Physiology* 496, 809—825. 1996.
- Potocnik, SJ; Hill, MA; Pharmacological evidence for capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in cannulated and pressurized skeletal muscle arterioles, *Br. J. Pharmacol*, 2001; 134:247–256.
- Ramos-Franco, J; Fill, M; Mignery, GA; Isoform-specific function of single inositol 1,4,5-triphosphate receptor channels. *Biophys J.*, 1998; 75:834-839.
- Ramos-Franco, J; Galvan, D; Mignery, GA; Fill, M; Location of the permeation pathway in the recombinant type I inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *J Gen Physiol*, 1999; 114:234-250.
- Rayment, I; Holden, HM; Whittaker, M; Yohn, CB; Lorenz, M; Holmes, KC; Milligan, RA. Structure of actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, 1993 a; 261: 58-65.

- Rayment, I; Holden, HM; Whittaker, M; Yohn, CB; Lorenz, M; Holmes, KC; Milligan, RA. Structure of actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, 1993 b; 261: 58-65.
- Ringer, S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *Journal of Physiology*, 1883; 4: 29-47.
- Roberts JF, Attari N, Sherriff M. The survival of resin modified glass ionomer and stainless steel crown restorations in primary molars, placed in a specialist paediatric dental practice. *Br. Dent. J.* 2005; 198: 427-31.
- Rüegg, JC. Towards a molecular understanding of contractility. *Cardioscience*, 1990; 1: 163-167.
- Sasaki, T; Inui, M; Kimura, Y; Kuzuya, T; Tada, M. Molecular mechanism of regulation of Ca<sup>2+</sup> pump ATPase by phospholamban in cardiac sarcoplasmic reticulum. Effects of synthetic phospholamban peptides on Ca<sup>2+</sup>-pump ATPase. *J Biol Chem*, 1992; 267:1674–1679.
- Scales, DJ. Aspects of the mammalian cardiac sarcotubular system revealed by freeze-fracture electron microscopy. *Journal of Molecular Cell Cardiology*, 1981; 13: 373-380.
- Scholz, J; Schaeffer, B; Schmitz, W; Scholz, H; Steinfath, M; Lohse, M; Schwabe, U and Puurunen, J.  $\alpha_1$ -adrenoreceptor-mediated positive inotropic effect and inositol trisphosphate increase in mammalian heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988; 245:337-345.
- Schouten, V.J.A.; Morad, M. Regulation of Ca<sup>2+</sup> Current in Frog Ventricular Myocytes by the Holding Potential, Camp and Frequency. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 1989; 415:1-11.
- Schumann HJ, Wagner J, Knorr A, Reidemeister JC, Sadony V & Schramm G. Demonstration in human atrial preparations of  $\alpha$ -adrenoceptors mediating

positive inotropic effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1978; 302:333–336.

Sensch O, Vierling W, Brandt W, Reiter M. Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of beta-caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 131: 1089-96.

Sensch, O; Vierling, W; Brandt, W; Reiter, M. Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of  $\beta$ -caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. *British Journal of Pharmacology*, 131, 1089  $\pm$ 1096, 2000.

Sham, JSK; Hatem, SN; Morad, M. Species differences in the activity of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in mammalian cardiac myocytes. *Journal of Physiology*, 1995; 488: 623-631.

Sharma, A. K.; Sharma, A. *Plant chromosomes: analysis, manipulation and engineering*. Amsterdam: Harwood Academic, 1999. 371 p.

Sheehan, K.A.; Blatter, L.A. Regulation of junctional and non-junctional sarcoplasmic reticulum calcium release in excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *Journal of Physiology-London*, 2003; 546:119-135.

Silva, S. de O. e; Rocha, S.A.; Alves, E. J.; Credico, M.; Passos, A. R. Caracterização morfológica e avaliação de cultivares e híbridos de bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 22, p. 161-169, 2000.

Singer, D; Biel, M; Lotan, I; Flockerzi, V; Hofmann, F; Dascal, N; The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science*, 1991; 253:1553-1557.

Singer, S.J.; Nicolson, G.L. Fluid Mosaic Model of Structure of Cell-Membranes. *Science*, 1972: 175:720.

- Skomedal T, Aass H, Osnes JB, Fjeld NB, Klingen G, Langslet A & Semb G. Demonstration of alpha adrenoceptor-mediated inotropic effect of norepinephrine in human atria. *J Pharmacol Exp Therapeutics*, 1985; 233:441–446.
- Sluder, G. The practical use of colchicine and colcemid to reversibly block microtubule assembly in living cells. In: K. Adolph, editor. *Marcel Dekker Inc., Advanced Techniques in Chromosome Research*. New York. p. 427-447, 1991.
- Smith, JS; Rousseau, E and Meissner, G. Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum Ca release channels from cardiac and skeletal muscle. *Circ Res*, 1989; 64:352-359.
- Solaro, RJ & Rarick, HM. Troponin and tropomyosin—proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ. Res*, 1998; 83, 471–480.
- Solovyova, N. Pernyhough, P; Glazner, G; Verkhatsky, A. Xestospongins empty the ER calcium stores but do not inhibit InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release in cultured dorsal root ganglia neurons. *Cell Calcium*, 2002; 32:49-52.
- Sperelakis, N; Katsube, Y; Yokoshiki, H; Sada, H; Sumii, K. Regulation of the slow Ca<sup>2+</sup> channels of myocardial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1996; 163-164: 85-98.
- Steinberg SF, Drugge ED, Bilezikian JP & Robinson RB. Acquisition by innervated cardiac myocytes of a pertussis toxin-specific regulatory protein linked to the alpha 1-receptor. *Science*, 1985; 230:186–188.
- Stephenson, D. G & West, J. M. Contractile activation and the effects of 2,3-butanedione (BDM) in skinned preparations from normal and dystrophic mice. *Pflug. Arch-Eur. J. Physiol.* 413, 546-552, 1989.

- Stephenson, DG; Wendt, IR. Effects of procaine on calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum of mechanically disrupted rat cardiac muscle. *J. Physiol*, 1986; 373:195-207.
- Stewart, PS; & MacLennan, DH. Surface particles of sarcoplasmic reticulum membranes. Structural features of the adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*; 1974, 249: 985-993.
- Sticht, FD & Smith, RM. Eugenol: some pharmacologic observations. *Journal of Dental Research*, 1971; 50: 1531-1535.
- Südhof, T; Newton, C; Archer, B; Ushkaryov, Y and Mignery, G. Structure of a novel  $\text{InsP}_3$  receptor. *EMBO (Eur Mol Biol Orgn)*, 1991; 11:3199-3206.
- Supattapone, S; Worley, PF; Baraban, JM and Snyder, SH. Solubilization, purification and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, 1988; 263:1530-1534.
- Taylor CW; da Fonseca PC; Morris EP.  $\text{IP}_3$  receptors: the search for structure. *Trends Biochem Sci*, 2004; 29: 210–219.
- Terzic A, Puceat M, Clement O, Scamps F & Vassort G. Alpha 1-adrenergic effects on intracellular pH and calcium and on myofilaments in single rat cardiac cells. *J Physiol*, 1992; 447:275–292.
- Thompson D, Norbeck K, Olsson LI, Constantintodosiu D, Vanderzee J, Moldeus P. Peroxidase-catalyzed oxidation of eugenol - formation of a cytotoxic metabolite(s). *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 1016-21.
- Thompson, D & Eling, T. Mechanism of inhibition of prostaglandin H synthase by eugenol and other phenolic peroxidase substrates. *Molecular Pharmacology*, 1989; 36: 809-817.
- Thompson, D; Norbeck, K; Olsson, L-I; Constantin-Teodosiu, D; van der Zee, J; Moldéus, P. Peroxidase-catalyzed oxidation of eugenol: Formation of a cytotoxic metabolite(s). *The Journal of Biological Chemistry*, 1989; 264(2): 1016-1021.

- Tripathy,A.; Xu,L.; Pasek,D.A.; Meissner,G. Effects of 2,3-butanedione 2-monoxime on  $Ca^{2+}$  release channels (ryanodine receptors) of cardiac and skeletal muscle. *Journal of Membrane Biology*, 1999; 169:189-198.
- Tsien, RW & Tsien, RY. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annual Reviews in Cell Biology*, 1990; 6:7715-760.
- Usta J, Kreydiyyeh S, Bajakian K, Nakkash-Chmairie H. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. *Food. Chem. Toxicol.* 2002; 40: 935-40.
- Vahebi, S; Ota, A; Manxiang, L; Chad, M.W; Pieter P. T; Yibin, W; Solaro, R.J; p38-MAPK Induced Dephosphorylation of  $\alpha$ -Tropomyosin Is Associated With Depression of Myocardial Sarcomeric Tension and ATPase Activity. *Circ Res.* 2007;100:408-415
- Vaughan-Jones, RD. Excitation and contraction in heart: the role of calcium. *Bristh Medical Bulletin*, 1986; 42: 413-420.
- Vergara, J. and C. Caputo. Effects of tetracaine on charge movements and calcium signals in frog skeletal muscle fibers. *Proceedings of the National Aeademy of Sciences, USA*, 1983; 80:14~77-1,481.
- Vites A-M, Pappano AJ; Distinct modes of inhibition by ruthenium red and ryanodine of calcium-induced calcium release in avian atrium. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994; 268:1476–1484
- Wang,Y.G.; Dedkova,E.N.; Ji,X.; Blatter,L.A.; Lipsius,S.L. Phenylephrine acts via IP3-dependent intracellular NO release to stimulate L-type  $Ca^{2+}$  current in cat atrial myocytes. *Journal of Physiology-London*, 2005; 567:143-157.
- Warshaw, DM. The in vitro motility assay: A window into the myosin molecular motor. *News in Physiological Sciences*, 1996; 11: 1-7.
- Wei, XY; Pan, S; Lang, WH; Kim HY; Schneider, T; Perez-Reyes, E; Birnbaumer, L; Molecular determinants of cardiac  $Ca^{2+}$  channel pharmacology – Subunit

requirement for the high affinity and allosteric regulation of dihydropyridine binding. *J Biol Chem*, 1995; 270: 27106-27111.

Wendt-Gallitelli, M.F. Presystolic calcium-loading of the sarcoplasmic reticulum influences time to peak force of contraction. X-ray microanalysis on rapidly frozen guinea-pig ventricular muscle preparation. *Basic Res. Cardiol.* 80, 617±625, 1985.

Wibo, M; Bravo, G; Godfraind, T. Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors. *Circulation Research*, 1991; 68: 662-673.

Wier, W. G. & Balke, C. W. Ca<sup>2+</sup> release mechanisms, Ca<sup>2+</sup> sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ. Res.* 1999; 85, 770–776.

Williams AJ; West DJ; Sitsapesan R; Light at the end of the Ca<sup>2+</sup>-release channel tunnel: structures and mechanisms involved in ion translocation in ryanodine receptor channels. *Q Rev Biophys*, 2001; 34: 61–104.

Williams, JH; Ward, CW; Reduced Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum at low pH. *Can J Physiol Pharmacol*, 1992; 70:926-930.

Winegrad, S. Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle. *Journal of General Physiology*, 1965; 48: 455-479.

Woodcock, EA; Matkovich, SJ. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> receptor and inositol phosphates in the heart – evolutionary artefacts or active signal transducers. *Pharmacology & Therapeutics*, 2005; 107:240-251.

Wright, SE; Baron, DA; Heffner, JE. Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: Proposed oxidant mechanisms. *Journal of Laboratorial and Clinical Medicine*, 1995; 125: 257-264.

- Wu,X.; Zhang,T.; Bossuyt,J.; Li,X.D.; McKinsey,T.A.; Dedman,J.R.; Olson,E.N.; Chen,J.; Brown,J.H.; Bers,D.M. Local InsP(3)-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *Journal of Clinical Investigation*, 2006; 116:675-682.
- Xu, L; Lai, FA; Cohn, A; Etter, E; Guerrero, A; Fay, FS; Meissner, G. Evidence for a Ca(21)-gated ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> release channel in visceral smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994; 91:3294–3298.
- Yamada, M; Miyawaki, A; Saito, K; Nakajima, T; Yamamoto-Hino, M; Ryo, Y; Furuichi, T; Mikoshiba, K; The calmodulin-binding domain in the mouse type 1 inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Biochem J*, 1995; 308:83-88.
- Yang,J.; McBride,S.; Mak,D.O.D.; Vardi,N.; Palczewski,K.; Haeseleer,F.; Foskett,J.K. Identification of a family of calcium sensors as protein ligands of inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002; 99:7711-7716.
- Yokoyama, C.T., et al. Mechanism of SNARE protein binding and regulation of Cav<sup>2</sup> channels by phosphorylation of the synaptic protein interaction site. *Mol. Cell. Neurosci.* 2005; 28:1–17.
- Yoshikawa F; Morita M; Monkawa T; Michikawa T; Furuichi T; Mikoshiba K; Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, 1996; 271: 18277–18284.
- Yue, DT; Marban, E; Wier, WG. Relationship between force and intracellular Ca<sup>2+</sup> in tetanized mammalian muscle. *Journal of General Physiology*, 1986; 87: 223-242.
- Zahradníková A, Palade P. Procaine effects on single sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release channel. *Biophys J*, 1993; 64:991–1003.

Zima, AV; Blatter, LA; Inositol-1,4,5-triphosphate-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias. *J Physiol*, 2004; 555:607-615.

Zot, AS & Potter, JD. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annual Review Biophysics and Chemistry*, 1987; 16: 535-559.