

MARCOS CLAUDIO SIGNORELLI

**EFEITOS DA SARCOSINA E DO ÓXIDO DE TRIMETILAMINA NA TRANSMISSÃO
NEUROMUSCULAR E NO PROCESSO DE ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-
CONTRAÇÃO DE MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE MAMÍFERO**

CURITIBA

2005

MARCOS CLAUDIO SIGNORELLI

**EFEITOS DA SARCOSINA E DO ÓXIDO DE TRIMETILAMINA NA TRANSMISSÃO
NEUROMUSCULAR E NO PROCESSO DE ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-
CONTRAÇÃO DE MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE MAMÍFERO**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rosalvo T. H. Fogaça

CURITIBA

2005

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado meu caminho, me fortalecendo e me guiando durante esta gratificante jornada. Hoje me considero uma pessoa abençoada, e se cheguei até aqui, é porque Ele está ao meu lado, segurando minha mão.

À minha família, meu porto seguro. Meus pais, Mário e Zulmira, pela vida que me deram, o amor, carinho, suporte e incentivo em seguir adiante.

Ao meu orientador, Professor Rosalvo Fogaça, que acima de tudo é meu grande amigo. Por todos os ensinamentos, pela paciência, pela confiança depositada em mim,... E como todo bom amigo, por ter sempre me guiado, inclusive a dar os passos mais importantes na minha vida.

Aos professores do Laboratório de Fisiologia da Contração Muscular, Professora Ilana Kassouf Silva e Professor Carlos Damiani, pela ajuda inestimável nos primeiros passos na pesquisa e na docência.

Aos demais professores do Departamento de Fisiologia, em especial ao Professor Oldemir Mangili por sua ajuda em tornar esta pesquisa melhor e à Professora Carolina Arruda Freire, pela importante colaboração na mensuração da osmolaridade das soluções empregadas neste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, Ana Paula, Laura, Fernando, pelos ensinamentos sobre as técnicas, pela amizade e o apoio.

Ao meu grande amigo Clóvis Wanzinack, por toda ajuda, nos melhores e nos piores momentos. Por estar sempre ao meu lado, me incentivando a ir adiante.

A todos os meus amigos e amigas, que sempre me apoiaram, e mesmo que indiretamente também me ajudaram nesta conquista.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e do Biotério, por toda ajuda, imprescindível à conclusão deste trabalho.

E finalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e à Universidade Federal do Paraná pela oportunidade.

Obrigado!

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito de soluções hipertônicas ajustadas com os osmólitos de ocorrência natural “**sarcosina**” e “**óxido de trimetilamina**” nos processos de transmissão neuromuscular e acoplamento excitação contração (AEC) de músculo estriado esquelético de mamíferos. Estes osmólitos, encontrados especialmente em animais marinhos, sujeitos a grandes variações de salinidade, desempenha diversos papéis importantes, como o de proteger proteínas de condições desestabilizantes (altas temperaturas, baixos níveis de pH, altas concentrações de uréia e alta força iônica). Os papéis da **sarcosina**, entretanto, em funções celulares como a de acoplamento excitação-contração, e sua compatibilidade com mamíferos, não haviam sido sistematicamente investigados. Estudos preliminares em nosso laboratório demonstraram que este e outros osmólitos de ocorrência natural (como o **óxido de trimetilamina – TMAO**, e betaína) alteram a contratatura potássica e aquela induzida por cafeína, afetando, portanto, importantes etapas do AEC. Neste estudo observou-se que a **sarcosina** parece ser compatível com a espécie estudada, mantendo e em alguns casos até mesmo potencializando a força de contração do músculo diafragma, mas apenas quando empregada em baixas concentrações (até 100 mM). Quando empregada em altas concentrações (maiores que 100 mM), é capaz de extinguir reversivelmente a contração do músculo. Este efeito parece ser decorrente da tonicidade do meio, uma vez que não exhibe diferenças quando comparada com a sacarose, comparada com idêntica concentração osmolar. O **TMAO**, diferentemente da **sarcosina**, pode ser capaz de potencializar grandemente a contração induzida por estímulo elétrico indireto, mesmo em concentrações mais elevadas (300 mM). Acredita-se que o efeito dos osmólitos seja sobre a estabilidade de estruturas e funções protéicas envolvidas no AEC, em diferentes proporções, dependendo do osmólito. Com esta investigação sugere-se que o **TMAO** seja mais eficaz que a **sarcosina** na manutenção de estados conformacionais protéicos que favoreçam o AEC, promovendo a contração muscular.

Palavras-chave: sarcosina, TMAO, acoplamento excitação-contração, osmólitos, músculo esquelético.

ABSTRACT

This study has evaluated the effects of hypertonic solutions, adjusted with "sarcosine" and "trimethylamine N-oxide", organic osmolytes of natural occurrence, on mammalian skeletal muscle process of excitation-contraction coupling (ECC). These osmolytes, especially found in marine animals, which are submitted to great variations of salinity, play many important roles, protecting proteins against denaturing conditions (high temperature, low pH level, high urea concentrations and high ionic force). However, the role of sarcosine in cell functions such as excitation-contraction coupling, and its compatibility with mammals, had not yet been investigated. Preliminary studies performed in our laboratory had demonstrated that this and other natural osmolytes (such as trimethylamine oxide - TMAO, and betaine) can modify the potassium contraction and that one induced by caffeine, affecting therefore, important steps of the ECC. In this study, we observed that sarcosine seems to be compatible with rat, maintaining and even sometimes increasing the contraction force of the diaphragm muscle. The effect was only observed when low concentrations (less than 100 mM) were used. When high concentrations (higher than 100 mM) were used, it reversibly extinguished muscle contraction. This effect seems to be caused by the hypertonicity, once there is no difference between the results obtained here and those observed with sucrose. TMAO, differently from sarcosine, is able to greatly potentiate the contraction indirectly induced by electrical stimulation, even in higher concentrations (300 mM). It is believed that the osmolytes effects are based on the structural and functional stability of the ECC involved proteins. These effects depend of which osmolyte is in use. With this work we suggest that TMAO is more efficient than sarcosine in supporting favourable conformational protein folding that favors the ECC, promoting muscle contraction.

Key words: sarcosine, TMAO, excitation-contraction coupling, osmolytes, skeletal muscle.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Aspectos estruturais do tecido muscular esquelético	13
Figura 2	Estrutura do filamento fino contendo as proteínas actina, troponina e tropomiosina, bem como do filamento grosso, contendo a proteína miosina, composta por duas cabeças e uma cauda	14
Figura 3	Morfofisiologia da junção neuromuscular	16
Figura 4	Detalhe da tríade, contendo os canais RyR do retículo sarcoplasmático e DHP da membrana do túbulo-T	19
Figura 5	Modelo do mecanismo de contração muscular	21
Figura 6	Efeitos do TMAO sobre a estabilidade conformacional da proteína CI2, frente à exposição à uréia ou a altas temperaturas	27
Figura 7	Estrutura química e esquema tridimensional da molécula de sarcosina	27
Figura 8	Abalo, nível basal de contração, e produção máxima de força em preparações de nervo frênico-músculo diafragma de ratos incubadas com óxido de trimetilamina (TMAO) ou sacarose	30
Figura 9	Produção de força mediante adição de óxido de trimetilamina (TMAO) (100 mM) sobre a contração obtida com cafeína (2 mM) em músculo esquelético de rã	31
Figura 10	Procedimento cirúrgico e dissecação de feixe muscular de diafragma de rato	37
Figura 11	Acoplamento do feixe muscular ao sistema de aquisição e registro de dados	38
Figura 12	Imagem da câmara acrílica contendo as diferentes soluções empregadas no protocolo de fibra permeabilizada e a fibra muscular presa a uma haste móvel e a um transdutor de força	41
Figura 13	Protocolo experimental de fibra permeabilizada com saponina	43
Figura 14	Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo de uma preparação estimulada por contratura potássica na ausência e na presença de sacarose ou sarcosina (50 mM)	48
Figura 15	Efeitos da sacarose ou sarcosina na produção de força induzida ou não por 100 mM de K ⁺ de músculo diafragma de rato	49

Figura 16	Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo de uma preparação estimulada por contratura cafeínica na ausência e na presença de sacarose ou sarcosina (50 mM)	51
Figura 17	Efeitos de soluções hipertônicas na contração muscular induzida pela cafeína (3 mM) em relação à contratura potássica	52
Figura 18	Efeitos de soluções hipertônicas na contração muscular induzida pela cafeína (3 mM) em relação à contratura cafeínica (3 mM)	53
Figura 19	Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo de uma preparação estimulada indiretamente na ausência e na presença de concentrações crescentes de sacarose	55
Figura 20	Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo de uma preparação estimulada indiretamente na ausência e na presença de concentrações crescentes de sarcosina	56
Figura 21	Efeitos de soluções hipertônicas na produção de força de músculo diafragma de rato estimulado indiretamente	57
Figura 22	Efeitos de soluções hipertônicas na produção de força de músculo diafragma de rato estimulado indiretamente	58
Figura 23	Registro original de um experimento típico de uma preparação de músculo diafragma eletroestimulado indiretamente, na ausência e na presença de adição súbita de sacarose ou sarcosina (300 mM)	59
Figura 24	Efeitos da exposição súbita à soluções contendo sarcosina ou sacarose (300 mM) na produção de força de músculo diafragma de rato estimulado indiretamente	60
Figura 25	Efeitos de soluções hipertônicas na produção de força de músculo diafragma de rato estimulado diretamente	64
Figura 26	Registro original de um experimento típico de uma preparação de músculo diafragma de rato curarizado e eletroestimulado diretamente, na ausência e na presença da adição súbita de sacarose ou sarcosina (300 mM)	65
Figura 27	Efeitos da exposição súbita a soluções contendo sarcosina ou sacarose (300 mM) na produção de força de músculo diafragma de rato estimulado diretamente	66
Figura 28	Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo de uma preparação estimulada indiretamente na ausência e na presença de concentrações crescentes de TMAO ou de sacarose	67

Figura 29	Nível basal de contração de músculo diafragma de rato estimulado indiretamente na presença de sacarose ou TMAO	68
Figura 30	Produção de força (abalo) de músculo diafragma de rato estimulado indiretamente na presença de sacarose ou TMAO	69
Figura 31	Amplitude máxima de contração de músculo diafragma de rato estimulado indiretamente na presença de sacarose ou TMAO	70
Figura 32	Produção de força (abalo) de músculo diafragma de rato estimulado diretamente na presença de sacarose ou TMAO	71
Figura 33	Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo de uma preparação permeabilizada com saponina, na ausência e na presença de sacarose ou sarcosina (50 e 100 mM)	73
Figura 34	Efeitos de soluções hipertônicas sobre a produção de força de músculo ílio-psoas de rato permeabilizado com saponina	74
Figura 35	Efeitos da sarcosina ou sacarose na variação da massa celular de músculo diafragma de rato	75
Figura 36	Aumento na estabilidade do enovelamento da ribonuclease carboxiamidada T1 (TCAM-RNase) na presença de 1M de osmólitos em relação à estabilidade em solução sem osmólitos	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações plasmáticas e intramusculares dos principais osmólitos presentes em peixes elasmobrânquios	29
Tabela 2	Composição da solução Tyrode	44
Tabela 3	Composição das soluções para fibras quimicamente desmembranadas	44
Tabela 4	Reagentes empregados, fabricante e lote de fabricação	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC: Acoplamento excitação-contração
ATP: Adenosina trifosfato
BES: Ácido N,N-Bis (2 hidroxietil-2-aminoetanosulfônico)
CO₂: Dióxido de carbono
DHP: Receptor dihidropiridínico
EGTA: Ácido etileno bis (b-amino etil éter N, N, N', N' tetracético)
GPC: Glicerofosforilcolina
Hz: Hertz
IP₃: Trifosfato de inositol
kDa: Kilodalton
K_m: Constante de Michaelis-Menten
mM: Milimolar (10⁻³ M)
mN: Milinewton (10⁻³ N)
ms: Milisegundos
μM: Micromolar (10⁻⁶ M)
μm: Micrômetro (10⁻⁶ m)
M: Molar
mOsm: Miliosmol
nM: Nanomolar (10⁻⁹ M)
O₂: Oxigênio
pCa: Potencial calciônico = -log[Ca²⁺]
pH: Potencial hidrogeniônico = -log[H⁺]
RS: Retículo sarcoplasmático
RyR: Receptor rianodínico
Solução C: Solução de carregamento
Solução L: Solução para liberação de cálcio do retículo
Solução R: Solução de relaxamento
TMAO: Óxido de trimetilamina
TnC: Troponina C
TnI: Troponina I
TnT: Troponina T
TRIS: Tris-(hidroxymethyl)-aminomethane
V_{máx}: Velocidade de máxima de reação

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Músculo estriado esquelético: aspectos estruturais.....	12
1.2 Músculo estriado esquelético: funcionamento.....	17
1.3 Músculo estriado esquelético: Acoplamento Excitação-Contração (AEC).....	18
1.4 Tonicidade do meio e suas implicações funcionais para as células musculares.....	22
1.5 Osmólitos de ocorrência natural.....	25
2 – JUSTIFICATIVA.....	33
3 - OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Materiais.....	35
4.2 Métodos.....	36
4.2.1 Músculo intacto	36
4.2.2 Fibra muscular desmembranada com o uso de saponina.....	40
4.2.3 Massa celular.....	42
4.3 Composição das soluções empregadas neste estudo	44
4.3.1 Reagentes empregados.....	45
4.4 Análise estatística.....	46
5 – RESULTADOS	47
5.1 Contratura potássica.....	47
5.2 Contratura cafeínica.....	47
5.3 Contração por estímulo elétrico indireto.....	50
5.4 Contração por estímulo elétrico direto.....	61
5.5 Experimentos com TMAO.....	62
5.6 Fibra permeabilizada com saponina.....	63
5.7 Massa Celular.....	72
6 – DISCUSSÃO	76
7 – CONCLUSÕES.....	90
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

O movimento representa uma característica associada a diversas formas de vida. No reino animal, a locomoção, seja caminhando, correndo, saltando, voando ou nadando irá garantir a sua própria sobrevivência. Tais atividades são possíveis graças à ação conjunta do sistema nervoso e da musculatura estriada esquelética. O sistema nervoso atua como um centro controlador, enquanto os músculos estriados esqueléticos funcionam como efetores, produzindo as contrações musculares, e conseqüentemente, alavancando os movimentos.

1.1 Músculo estriado esquelético: aspectos estruturais

As células musculares (fibras musculares), são células multinucleadas, que podem atingir vários centímetros, ou até metros de comprimento. A membrana celular, também denominada sarcolema, delimita a célula. No interior da célula, em seu citoplasma encontram-se além dos núcleos, mitocôndrias, que garantem o suporte energético, e o retículo endoplasmático, que recebe o nome de retículo sarcoplasmático. Esta organela irá funcionar como a principal fonte intracelular de íons cálcio (ALBERTS *et al.*, 1997).

No interior das fibras musculares encontram-se as miofibrilas, que consistem em estruturas cilíndricas com 1 a 2 μm de diâmetro e disposição longitudinal à fibra. Ao microscópio óptico, as miofibrilas aparecem com uma seqüência de estriações transversais, alternando faixas claras e escuras. Essas estriações são devidas às repetições de unidades morfofuncionais, chamadas sarcômeros, e dão ao músculo esquelético a característica e o nome de estriado (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Cada miofibrila, por sua vez, é formada por cerca de 1500 filamentos de miosina e 3000 filamentos de actina adjacentes, que são grandes moléculas protéicas polimerizadas, responsáveis pela contração muscular. A figura 1 representa esquematicamente a organização estrutural do músculo estriado esquelético. Os filamentos espessos, de miosina, e os finos, de actina, se interdigitam em alguns locais, dando o aspecto de faixas escuras nestes locais. As faixas claras contêm apenas filamentos de actina e são chamadas de *faixas I*, pois são isotrópicas à luz polarizada. As faixas escuras contêm filamentos de miosina sobrepostos aos filamentos de actina e são denominadas *faixas A*, pois são anisotrópicas à luz polarizada. As extremidades dos filamentos de actina se fixam às *linhas Z* ou também conhecidas como *discos Z*. Estes

são formados por proteínas filamentosas que passam transversalmente através da miofibrila e de uma miofibrila à outra, unindo-as e delimitando os sarcômeros (GUYTON & HALL, 2002).

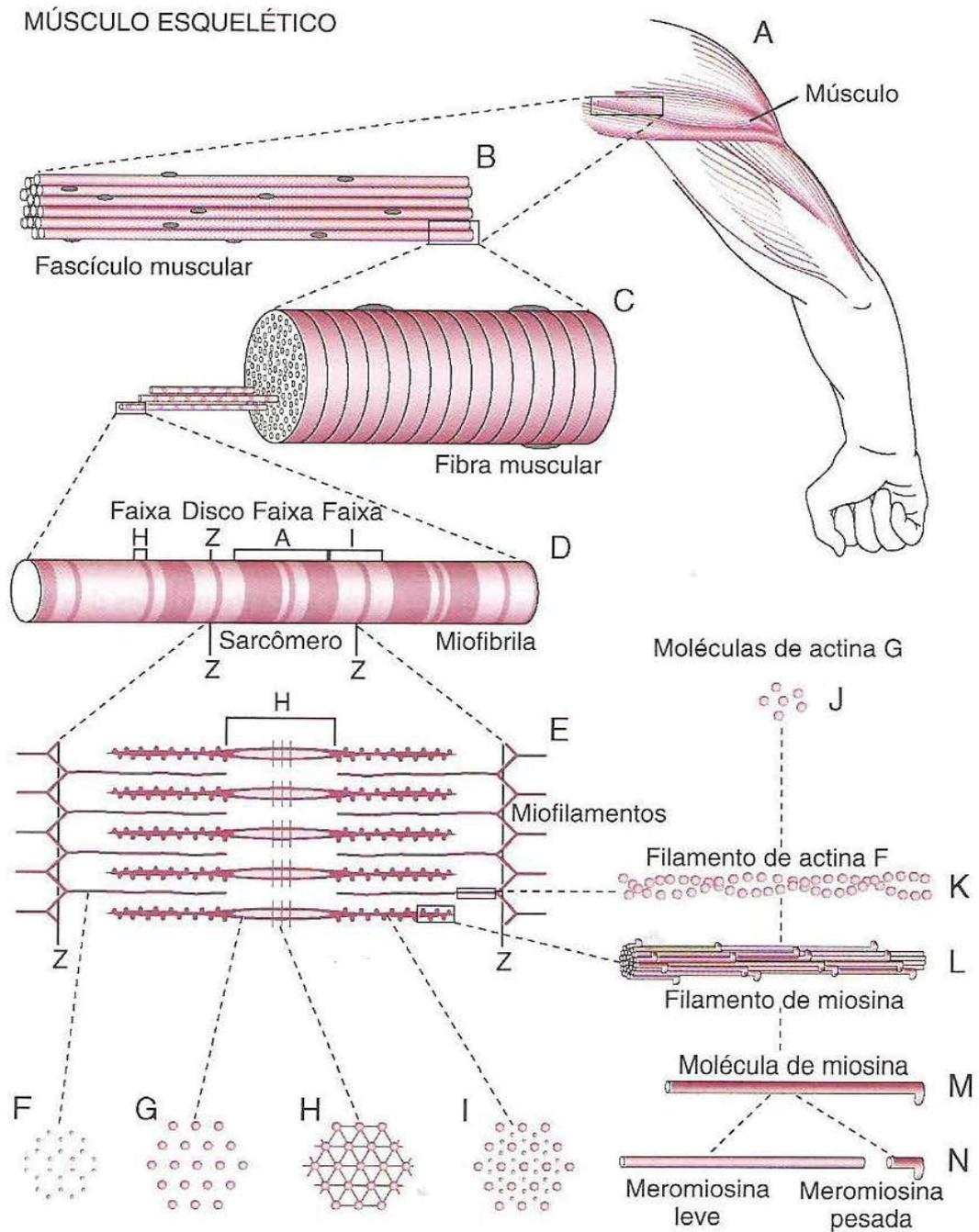


Figura 1: Aspectos estruturais do tecido muscular esquelético. Fonte: GUYTON & HALL (2002).

Os filamentos grossos contêm cerca de trezentas moléculas de miosina, além de outras proteínas como a titina. Cada cadeia pesada da miosina apresenta a conformação de uma α -hélice e uma cabeça globular com atividade ATPase, a qual forma as pontes cruzadas que interagem com a actina no filamento fino (BERS, 2002). O filamento fino é constituído de duas cadeias da proteína globular actina-G, formando um polímero filamentar denominado actina-F. Outras duas proteínas compõem o filamento fino: troponina e tropomiosina (Figura 2). A tropomiosina é uma molécula longa e fina, formada por duas cadeias peptídicas, estando em volta do filamento de actina (GARRET & GRISHAM, 1995). A troponina é um complexo protéico formado por três subunidades protéicas, denominadas troponina C, T e I. A troponina C (TnC) é assim designada porque se liga ao íon cálcio. A troponina I (TnI) é a subunidade inibidora que se liga à actina, não sendo capaz de ativar a contração muscular. Já a troponina T (TnT) é a subunidade que se liga a tropomiosina (MOSS E HOFMANN, 1992; LEAVIS E GERGELY, 1984).

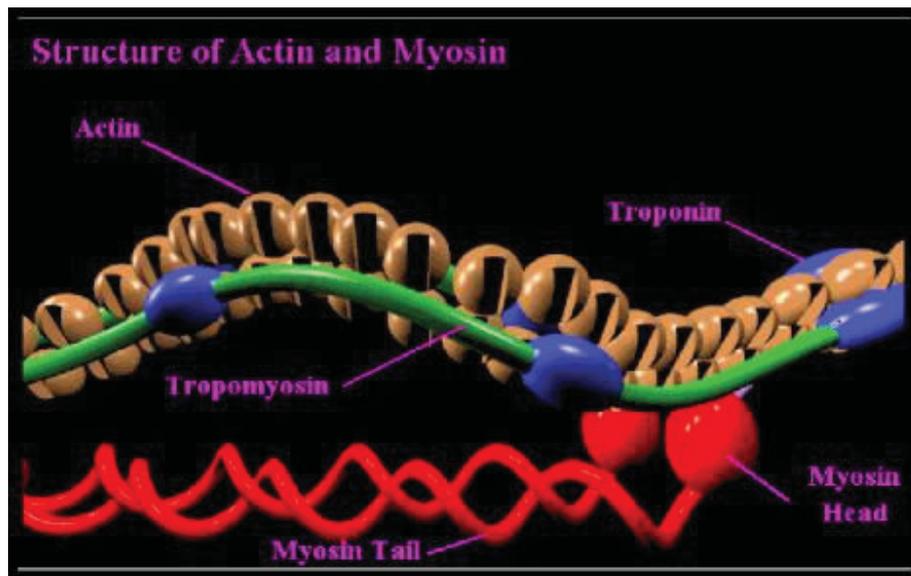


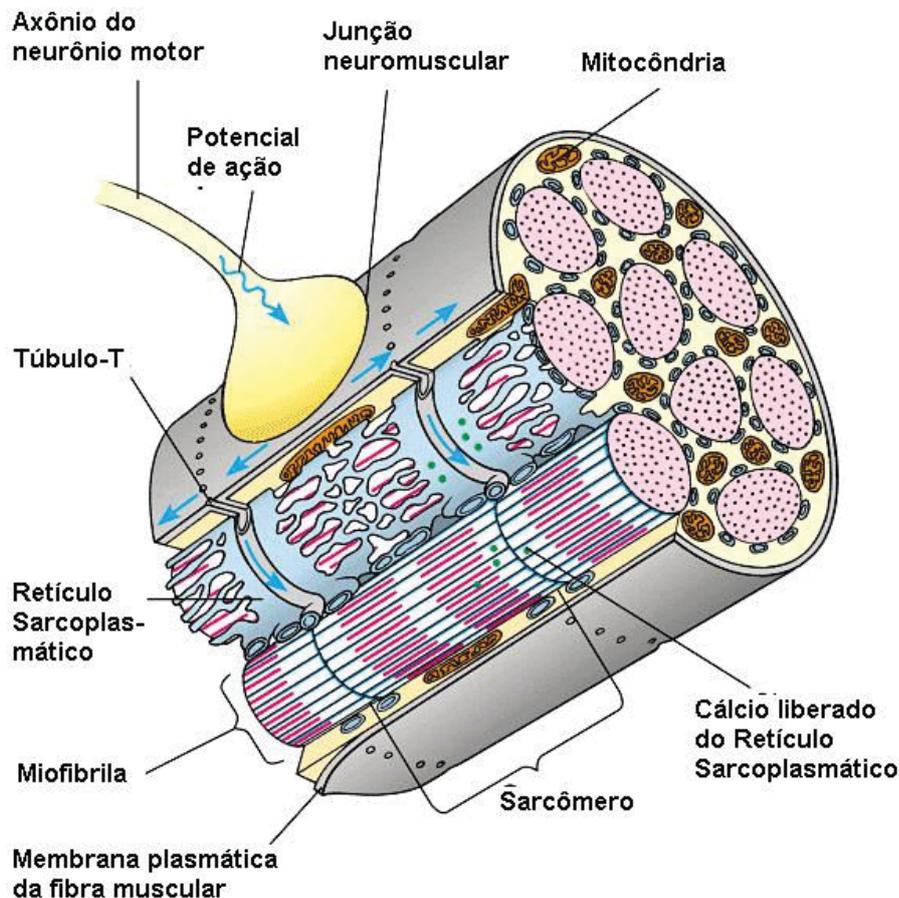
Figura 2: Estrutura do filamento fino contendo as proteínas actina, troponina e tropomiosina, bem como do filamento grosso, contendo a proteína miosina, composta por duas cabeças e uma cauda.

A TnT possui uma região carboxi-globular e uma forma alongada que percorre a molécula de tropomiosina e três monômeros de actina. Assim a TnT pode controlar a posição da tropomiosina. A TnI, próximo de sua região amino-terminal, interage com a região carboxi-terminal de ambas, TnT e TnC. Esta interação depende da ligação de

cálcio ou magnésio no sítio carboxi-terminal da TnC. Durante o relaxamento, a região carboxi-terminal da TnI também se liga a actina, impedindo a cabeça da miosina de se ligar com a actina. Após o aumento da concentração intracelular de cálcio, este se liga na região amino-terminal da TnC, que possui um sítio de ligação para cálcio e dois sítios que ligam cálcio ou magnésio competitivamente. Então, parte da TnC se liga a região carboxi-terminal da TnI e isto causa a dissociação da TnI da actina. A TnT provoca o movimento da tropomiosina, descobrindo os sítios de ligação de alta afinidade entre as cabeças de miosina e actina, permitindo a interação actino-miosina (FLICKER *et al.*, 1982; BERS, 2002). Existem ainda outras proteínas estruturais, como a distrofina, que liga os filamentos de actina a proteínas integrais da membrana plasmática e a nebulina que mantém a organização da actina e o comprimento dos filamentos durante o desenvolvimento da força muscular (ALBERTS *et al.*, 1997; MILLEVOI *et al.*, 1998).

Além do formato, tamanho e da presença de proteínas contráteis, as fibras musculares apresentam outras peculiaridades estruturais, que as tornam distintas de outras células do corpo. Uma dessas características é a presença dos túbulos transversos. Os túbulos transversos ou Túbulos-T, são invaginações do sarcolema presentes em intervalos regulares ao longo da membrana. Essas invaginações membranosas permitem que a despolarização do sarcolema propague-se para o interior da fibra, atingindo as porções terminais dos sarcômeros, presentes nas regiões internas da fibra muscular, conforme observado na figura 3 (GARRET & GRISHAN, 1995).

A ativação da contração muscular depende da presença de íons cálcio no meio intracelular (ASHLEY *et al.*, 1991; LAMB, 2000; BRENNER, 1986; BRENNER, 1988). Acredita-se que em músculo esquelético a principal fonte de íons cálcio, necessários para a ativação do sistema contrátil, seja o retículo sarcoplasmático (ASHLEY *et al.*, 1991, LACAMPAGNE *et al.*, 2000). Os túbulos-T estão em íntimo contato com as cisternas terminais do retículo sarcoplasmático, as quais constituem-se na porção membranosas intracelular das extremidades deste sistema. As extremidades destas membranas localizam-se ao nível de cada disco Z dos sarcômeros. A cisterna terminal do retículo sarcoplasmático é contígua à outra região designada sistema longitudinal, a qual percorre radialmente as miofibrilas (BLOCK *et al.*, 1988). As junções das membranas dos túbulos-T com as das cisternas terminais do retículo sarcoplasmático formam, quando analisadas por microscópio eletrônico, as tríades (BLOCK *et al.*, 1988; FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997).



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figura 3 – Morfofisiologia da junção neuromuscular. As setas indicam a propagação do potencial de ação ao longo do sarcolema e para o interior dos túbulos-T.

Fonte: <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/neuro/c49x35TTube.jpg>

Na membrana dos túbulos-T estão presentes proteínas que funcionam como canais de cálcio (RIOS & BRUMM, 1987). Estes são denominados receptores dihidropiridínicos (DHP). Recebem este nome devido à alta afinidade por compostos dihidropiridínicos capazes de se ligar a essa proteína. Exemplos desses compostos são a nifedipina e nitrendipina, que agem como bloqueadores desses canais. Os receptores DHP atuam como sensores de voltagem durante o processo de acoplamento excitação-contração (POSTERINO & LAMB, 1998; RIOS & PIZARRO, 1991).

Estudos de microscopia eletrônica demonstram estreita associação entre a proteína liberadora de cálcio do retículo e os receptores DHP (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997; TAKEKURA & FRANZINI, 1999). A droga rianodina liga-se especificamente a essa proteína da membrana do retículo sarcoplasmático, e por esta

razão tais estruturas são classificadas como receptores rianodínicos (RyR). Esta droga, quando presente em baixas concentrações (250 nM), provoca a abertura do canal e quando em concentrações acima de 100 μ M, promove seu fechamento (ASHLEY *et al.*, 1991).

Cada monômero deste receptor tem massa molecular de 560 kDa, sendo que o receptor funciona como um tetrâmero (SAITO *et al.*, 1988, WAGENKNECHT *et al.*, 1989). Três tipos de receptores RyR têm sido descritos: RyR1, chamado de isoforma esquelética, presente no músculo esquelético, algumas partes do cérebro e células de Purkinje do cerebelo; RyR2, dominante no músculo cardíaco mas também presente no cérebro; e RyR3, denominada isoforma cerebral, encontrada no sistema nervoso central e também em células epiteliais e músculo esquelético de algumas espécies (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997).

Pesquisas utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MOSS & HOFMANN, 1992) demonstraram a existência de estruturas eletrondensas, denominadas pés juncionais (FRANZINI-ARMSTRONG & NUNZI, 1983), que representam pontes situadas no espaço de aproximadamente 10 nm, entre as membranas dos túbulos-T e do retículo sarcoplasmático. Hoje se sabe que essas estruturas são os receptores RyR, presentes na cisterna terminal do retículo e que quando se encontram em estados conformacionais abertos, permitem a liberação do cálcio estocado no retículo (RIOS & PIZARRO, 1991; FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997).

Em músculo esquelético de mamíferos, a abertura dos canais de cálcio presentes na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático e a conseqüente liberação de cálcio poderia ocorrer em conseqüência das alterações da voltagem ou em conseqüência do fluxo de corrente que seria propagado a partir dos receptores DHP existentes na membrana do sistema tubular transversal (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997; ASHLEY *et al.*, 1991; RIOS *et al.*, 1991; SCHNEIDER, 1994, FELDER *et al.*, 2002). Existem diversas teorias a respeito dos mecanismos envolvidos na liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático.

1.2 Músculo estriado esquelético: funcionamento

O mecanismo de desenvolvimento da contração muscular é conhecido como transdução quimiomecânica, onde as células musculares funcionam como transdutores

de energia química em energia mecânica. A contração dos músculos esqueléticos está sob o comando dos nervos motores, que emitem inúmeras ramificações para uma área especializada da membrana da fibra muscular esquelética, formando assim, a placa motora, ou junção neuromuscular. A terminação axônica apresenta numerosas vesículas sinápticas, contendo o neurotransmissor acetilcolina (HEUSER & REESE, 1973).

Fisiologicamente, o mecanismo de contração muscular depende da liberação do neurotransmissor acetilcolina. A partir de uma despolarização da membrana do neurônio motor, abrem-se canais de Ca^{2+} da membrana, sensíveis a variações de voltagem. A abertura destes canais promove o fluxo de Ca^{2+} para o interior do neurônio. Este influxo do íon cálcio promove então a fusão das vesículas contendo acetilcolina com a membrana do terminal axônico. Dessa forma, a acetilcolina é liberada na fenda sináptica, através de um processo conhecido como exocitose. A acetilcolina se difunde pela fenda sináptica, indo se ligar a receptores pós-sinápticos, denominados receptores nicotínicos, situados na membrana da célula muscular. A ligação da acetilcolina com seus receptores faz com que a membrana da fibra muscular fique mais permeável ao sódio e ao potássio. Como o gradiente eletroquímico para o sódio é maior do que para o potássio, o sódio se difundirá mais rapidamente para o interior da célula, resultando em despolarização parcial do sarcolema, dando origem ao potencial de placa motora (BERNE & LEVI, 2004; MOSS & HOFMANN, 1992). Um potencial de placa motora poderá, se atingir o limiar de excitabilidade da célula muscular, originar um potencial de ação que irá propagar-se ao longo do sarcolema e para o interior dos Túbulos-T. Assim, a onda de despolarização atinge as porções mais internas das fibras musculares, desencadeando o processo contrátil de forma homogênea (GARRET & GRISHAN, 1995).

Através de um processo descrito como acoplamento excitação-contração, o potencial de ação gerado no sarcolema promove a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. O Ca^{2+} pode então promover a interação mecânica entre os filamentos contráteis de actina e miosina no interior da célula, produzindo a contração do músculo (RIOS *et al.*, 1991).

1.3 Músculo estriado esquelético: Acoplamento Excitação-Contração (AEC)

O termo Acoplamento Excitação-Contração designa o processo que ocorre desde a despolarização da membrana excitável da célula muscular, até a liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares. Fisiologicamente, a despolarização da membrana

citoplasmática atinge o cerne da célula muscular, através dos túbulos-T. Tal evento induz, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, a liberação de íons cálcio do retículo (Figura 4) (LAMB, 2000; BRENNER, 1991, DIRKSEN, 2002, LACAMPAGNE *et al.*, 2000; SHOSHAN-BARTMATZ & ASHLEY, 1998).

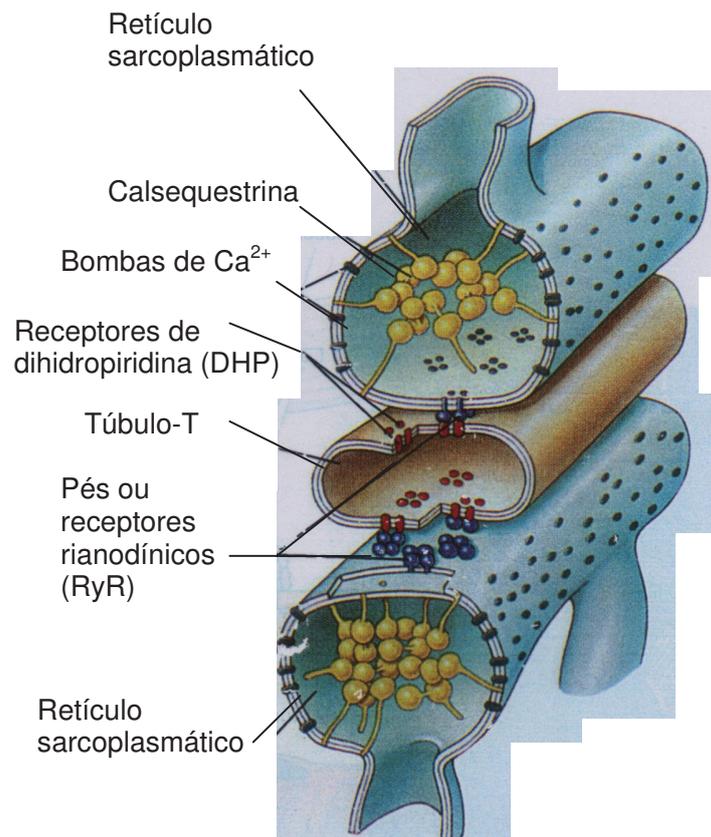


Figura 4: Detalhe da tríade, contendo os canais RyR do retículo sarcoplasmático e DHP da membrana do túbulo-T

A transdução do sinal elétrico a partir dos receptores DHP é realizada, provavelmente, graças à projeção de parte da molécula do RyR na membrana do retículo sarcoplasmático (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997, FELDER *et al.*, 2002, PROTASI, 2002). Além de um possível acoplamento elétrico entre os receptores DHP e RyR, outros mecanismos também têm sido propostos para se explicar a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático (VERGARA *et al.*, 1985).

Alguns trabalhos demonstram que a partir da despolarização do sarcolema, a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático poderia ser ocasionada pela presença de mediadores intracelulares, como o trifosfato de inositol (IP₃) (VALDIVIA *et al.*, 1992; VERGARA *et al.*, 1985; MISSIAEN *et al.*, 1992; TALON *et al.*, 2000; VOLPE *et al.*, 1985). Vários estudos demonstram que este composto pode estar envolvido na liberação de íons cálcio de estoques intracelulares de músculo liso e de outros tipos celulares (PERES *et al.*, 1991; FINCH *et al.*, 1991; ROJAS *et al.*, 1992). Um trabalho desenvolvido por LÓPEZ & TEZIC (1996), mostra que o IP₃, mas não outros fosfatos de inositol, induz um aumento da liberação de cálcio em músculo esquelético intacto, sendo este efeito bloqueado pela heparina. Algumas pesquisas têm demonstrado que, em músculo estriado, o IP₃ provavelmente promove contratura por induzir a mobilização de uma quantidade de íons cálcio, a qual não é mobilizada pela cafeína (ROJAS *et al.*, 1992). Seu papel na liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático de células de músculo esquelético e cardíaco permanece contudo, controverso (ASHLEY *et al.*, 1991).

Menos controverso tem sido o mecanismo de liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático induzido pela cafeína (ROUSSEAU & MEISSNER, 1989; MEISSNER *et al.*, 1991; ASHLEY *et al.*, 1991; SU & CHANG, 1993). Acredita-se que esta droga promove a abertura dos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático por um mecanismo similar ao da “liberação de cálcio induzida por cálcio”, provocando a contração, sem mudar o potencial de membrana (DELAY *ET AL.*, 1986; KONISHI & KURIHARA, 1987; RIOS & PIZZARRO, 1991; QUINN *et al.*, 1998; SEKIGUCHI & SHIMIZU, 1987).

Em músculo cardíaco de vertebrados e músculos estriados de crustáceos, acredita-se que a liberação de íons cálcio do RS seja ocasionada em consequência do influxo de íons cálcio, que ocorre durante a despolarização do sarcolema. Este mecanismo tem sido descrito como “liberação de cálcio induzida por cálcio” (FABIATO & FABIATO, 1978; FABIATO, 1981; FABIATO, 1992). O influxo de cálcio ocorre através dos canais de cálcio sensíveis às drogas do grupo das dihidropiridinas (POSTERINO & LAMB, 1998). Em músculo estriado de invertebrados este mecanismo parece desempenhar um importante papel na liberação de íons cálcio do RS (SUAREZ-KURTZ & SORENSON, 1977a; GYÖRKE & PALADE, 1992).

A teoria mais aceita atualmente sobre o AEC, seria a de um possível acoplamento mecânico entre os receptores DHP e RyR e foi originalmente proposta por CHANDLER *et al.*, 1976. De acordo com este princípio, haveria uma interação física entre esses dois receptores, onde domínios do receptor DHP se acoplam, ou interagem com o RyR na membrana do retículo sarcoplasmático (SCHNEIDER & CHANDLER, 1973). Tal interação alteraria a atividade deste canal, influenciando o processo de liberação de cálcio para o citoplasma. De lá para cá, muito tem se discutido acerca desta teoria. Alças citoplasmáticas que participam desta interação funcional já foram identificadas em cada proteína, porém o completo mecanismo e a natureza molecular da interação proteína-proteína permanecem desconhecidos (DULHUNTY, *et al.*, 2002). Estudos mais recentes sugerem ainda a participação de outras proteínas, como a FKBP12, mediando o acoplamento entre os receptores DHP e RyR (HAMILTON, 2000; ÁVILA, *et al.*, 2003).

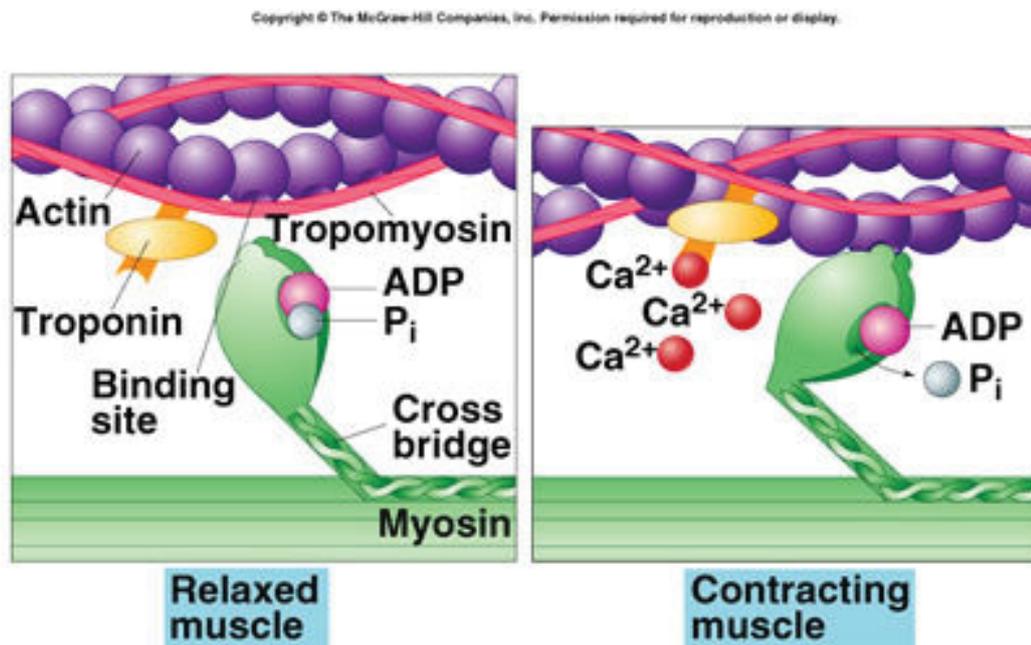


Figura 5: Modelo do mecanismo de contração muscular. À esquerda, o músculo em estado relaxado. À direita, após a ligação do cálcio com a molécula de Troponina C, o músculo em estado de contração.

Uma vez liberado o íon cálcio para o citoplasma, o íon Ca^{2+} irá se ligar a sítios de baixa afinidade existentes na molécula da troponina C, induzindo modificações conformacionais do complexo troponina-tropomiosina. Tais modificações permitem a interação cíclica de pontes transversas, entre os filamentos de miosina e os de actina, resultando no encurtamento e/ou produção de força pelo sistema contrátil (Figura 5) (GUTH & POTTER, 1987; BRENNER, 1986).

Para que ocorra o relaxamento da fibra muscular é necessário que a concentração intracelular de íons cálcio diminua para os valores de repouso (10^{-7} M). Isto é obtido graças a mecanismos de transporte ativo do íon cálcio do citoplasma para as organelas citoplasmáticas, principalmente para o retículo sarcoplasmático. Merecem destaque neste processo uma Ca^{2+} ATPase presente na membrana desta organela, denominada SERCA (“*Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*”) e ainda mecanismos de transporte iônico acoplado, principalmente o sistema de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ existente na membrana citoplasmática (BERS *et al.*, 1990; WOLSKA & LEWARTOWSKI, 1993).

1.4 Tonicidade do meio e suas implicações funcionais para as células musculares

Entende-se por tonicidade, o movimento de solvente, neste caso da água, entre dois compartimentos delimitados por uma membrana permeável ao solvente e/ou ao soluto (AIRES *et al.*, 1999). A tonicidade irá depender diretamente da diferença de osmolaridade existente entre dois compartimentos. Define-se osmolaridade de uma solução como o número de partículas osmoticamente ativas pelo volume da solução, onde partículas osmoticamente ativas são aquelas dissolvidas em meio líquido (AIRES *et al.*, 1999).

Com raras exceções, as membranas das células animais são altamente permeáveis à água. As membranas celulares não podem tolerar gradientes substanciais de pressão hidrostática efetiva e o movimento de água ao longo da membrana é em parte ditado pelos gradientes de pressão osmótica ($\Delta\pi$) e pressão hidrostática (ΔP), dependendo ainda da condutividade hidráulica da membrana. Então, desequilíbrios entre a osmolaridade intra e extracelular podem ser seguidos de um respectivo movimento de água ao longo da membrana, que pode levar a subseqüentes alterações no volume celular (LANG *et al.*, 1998).

Existem duas grandes classificações dentro do reino animal acerca do comportamento de seus organismos frente a variações osmóticas do meio. Os osmoconformadores, tendo como exemplo os invertebrados, se adaptam ao estresse osmótico acumulando um ou mais solutos em seu organismo. Alguns desses solutos são denominados “solutos compatíveis”, assim denominados por serem osmólitos que mesmo em altas concentrações, são benignos para funções celulares (HOCHACHKA & SOMERO, 2002). Dessa forma eles se mantêm isosmóticos em relação ao meio externo. Os osmorreguladores usam o transporte de íons para homeostaticamente, regular sua pressão osmótica interna, mantendo sua osmolaridade dentro de uma faixa constante (YANCEY, 2005). YANCEY (2005) ainda revela que alguns osmorreguladores utilizam osmólitos orgânicos em certas situações. Um exemplo dessa situação são os mamíferos, como roedores por exemplo, que em células da medula renal acumulam osmólitos, devido à alta osmolaridade presente no fluido extracelular deste órgão.

Diversas doenças também são capazes de produzir alterações consideráveis na osmolaridade extracelular em mamíferos. A osmolaridade extracelular pode estar aumentada na hipernatremia, devido ao excesso na ingestão de sal ou retenção de sal e/ou perda excessiva de água. E mesmo em situações fisiológicas, a osmolaridade interna também é constantemente alterada, mas mantida dentro de estreita faixa, graças a mecanismos de regulação. Um exemplo de situação que altera momentaneamente a osmolaridade é a grande variedade de vias metabólicas que levam à formação de substâncias osmoticamente ativas. O transporte dessas substâncias, produtos do metabolismo de glicose e ácidos graxos, por exemplo, é capaz de modificar de forma transitória a osmolaridade extracelular e também o volume celular das células expostas a este fluido (LANG *et al.*, 1998).

Diversas pesquisas procuram estudar as conseqüências de alterações de tonicidade e de volume celular nas funções celulares. Em uma extensa revisão de literatura efetuada por LANG *et al.* (1998), destacam-se como principais funções celulares afetadas pela hipertonicidade do meio extracelular: alterações na arquitetura do citoesqueleto, o transporte entre epitélios, a regulação do metabolismo, a liberação de hormônios e neurotransmissores, a probabilidade de abertura de canais da membrana, o potencial da membrana, o pH citosólico. Pode ainda levar a ativação de proteína quinase C, que pode fosforilar cadeias leves de miosina e fosforilação do transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ e também a alterações na expressão gênica, onde o enrugamento das células estimula a expressão de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*), que

contrabalançam o efeito deletério da hipertonicidade. Uma perda do teor hídrico celular, decorrente da hipertonicidade do meio extracelular, pode ainda exercer um efeito inotrópico positivo sobre o coração (LANG *et al.*, 1998). Com estudos como este, é possível elucidar alguns aspectos de alterações na tonicidade do meio sobre as funções celulares e suas implicações sobre a homeostasia.

Quando as células são expostas a um fluido extracelular hipertônico, elas inicialmente murcham, funcionando como um perfeito osmômetro, e então recuperam o volume celular original pelo chamado “aumento regulatório do volume celular” (RVI). Essa exposição ao fluido extracelular hipertônico não modifica apenas o volume das células, mas também das organelas internas, como mitocôndria e retículo. Paralelamente às alterações de osmolaridade celular, a força iônica celular é alterada, mesmo que a força iônica extracelular esteja constante (LANG *et al.*, 1998).

Diversos estudos têm demonstrado que variações da tonicidade da solução que banha as células musculares provocam profundas alterações na capacidade de produção de força contrátil (SATO & FUJINO, 1987; GODT *et al.*, 1984; SUAREZ-KURTZ & SORENSON, 1977b; PARKER & ZHU, 1987; GORDON & GODT, 1970).

As soluções extracelulares de elevada tonicidade (obtidas com NaCl ou sacarose), reduzem tanto o volume (devido à perda de água para o meio extracelular), quanto a contratilidade de células musculares de anfíbio (CAPUTO, 1968; VAUGHAN *et al.*, 1983; PIAZZESI *et al.*, 1994; GODT *et al.*, 1984). Há estudos que indicam ainda uma diminuição na velocidade máxima de encurtamento da fibra, além da redução de força (Edman & Huang, 1977, apud VAUGHAN *et al.*, 1983). Esta redução na capacidade de produção de força gerada pela hipertonicidade tem sido atribuída a diferentes mecanismos. O primeiro estaria relacionado a alterações no processo de acoplamento excitação-contração (SUAREZ-KURTZ & SORENSON, 1977b; COUTINHO *et al.*, 1982; SATO & FUJINO, 1987; CHAWLA *et al.*, 2001). O segundo mecanismo seria associado a uma diminuição de produção de força pelo sistema contrátil, decorrente do aumento da força iônica intracelular conseqüente ao fluxo resultante de água para o meio extracelular (GODT *et al.*, 1984; HOMSHER *et al.*, 1974; PIAZZESI *et al.*, 1994). Tal redução de força de contração foi revertida, quando adicionou-se à solução que mimetiza a do líquido intracelular, osmólitos de ocorrência natural, como o TMAO e a betaína (GODT *et al.*, 1993).

1.5 Osmólitos de ocorrência natural

Osmólitos são partículas osmoticamente ativas, como íons, aminoácidos e derivados, polióis e açúcares, compostos metilsulfônicos, uréia e metilaminas. Com exceção dos íons, estes solutos podem ser sintetizados por microorganismos, plantas e animais, em resposta ao estresse do meio em que se encontram, com a função de balancear o estresse osmótico. Exceto pela uréia e alguns íons inorgânicos, os osmólitos são freqüentemente chamados de solutos compatíveis, pois são destituídos de efeitos perturbadores sobre macromoléculas (YANCEY, 2005). Estes solutos apresentam algumas características em comum, tais como serem agentes estabilizadores de macromoléculas, possuírem baixa massa molecular, alta solubilidade em água e relativa permeabilidade à membrana (CONSTANZO & LEE-JR., 2005).

Algumas substâncias osmoticamente ativas podem desempenhar outras funções, como proteger proteínas contra desnaturação (PRADEEP & UDGAONKAR, 2004). Podem ainda, exibir um comportamento protetor frente a grandes variações de temperatura, preservar o teor hídrico intracelular e fortificar as membranas e macromoléculas intracelulares contra perturbações iônicas e osmóticas. (CONSTANZO & LEE-JR, 2005).

Diversos estudos demonstram a importância biológica de certos osmólitos intracelulares encontrados em várias espécies de animais marinhos e de estuários (ALTRINGHAM *et al.*, 1982; YANCEY *et al.*, 1982). Esses estudos sugerem que certos osmólitos teriam duplo papel: funcionar como osmólitos, balanceando o estresse osmótico, e ao mesmo tempo proteger estruturas celulares dos efeitos deletérios da elevada força iônica a qual resultaria da perda da água intracelular (YANCEY *et al.*, 1982; YANCEY & SOMERO, 1979; ZOU *et al.*, 2002).

Dentre os principais osmólitos orgânicos encontrados na natureza destacam-se alguns, os quais são classificados como: pequenos carboidratos incluindo açúcares (trehalose, por exemplo); polióis (glicerol, inosíóis, sorbitol, etc) e derivados (como α -metil-inositol); aminoácidos e derivados (glicina, prolina, taurina, trimetilglicina e ectoína); metilaminas [incluindo o óxido de trimetilamina (TMAO), sarcosina (N-metilglicina), betaína, glicerofosforilcolina (GPC)]; e solutos metilsulfônicos, incluindo dimetilsulfonopropionato (DMSP) e uréia (HAND & SOMERO, 1982; STEELE, *et al.*, 2004; YANCEY, 2005). Estes compostos são de ampla ocorrência na natureza. Metilaminas

como a betaína são encontradas em diversas espécies de animais. Taurina se concentra em animais marinhos e alguns tecidos dos mamíferos, como o músculo cardíaco. Os osmólitos classificados como carboidratos ocorrem em organismos dos reinos archaea, fungi, algae, plantas, também em células dos rins de mamíferos e possivelmente em invertebrados do fundo do mar. Açúcares e polióis são normalmente solutos dominantes em organismos que toleram o congelamento, como plantas terrestres, insetos, anfíbios e peixes polares. Muitos organismos, como peixes elasmobrânquios, utilizam combinações de osmólitos de diferentes categorias, como uréia e metilaminas, na proporção molar de 2:1 (YANCEY, 2005). As concentrações intracelulares e extracelulares destas pequenas moléculas orgânicas podem atingir níveis molares em situações extremas de estresse osmótico, sendo indispensáveis para a sobrevivência da maioria dos organismos (HOCHACHKA & SOMERO, 2002; YANCEY, *et al.*, 1982).

No grande grupo destes solutos compatíveis, merecem destaque as metilaminas. Estas podem estabilizar a conformação de proteínas e interação de ligantes, contrabalançando efeitos perturbadores da uréia e íons inorgânicos, e da pressão hidrostática de animais em regiões abissais (KELLY & YANCEY, 1999; YANCEY, 2005). Em um estudo sobre as metilaminas, desenvolvido por BENNION & DAGGETT (2004), foi observado que o TMAO é capaz de contrabalançar os efeitos deletérios da uréia (em uma proporção de concentração de 2:1, entre uréia e TMAO) e de altas temperaturas (BENNION E DAGGETT, 2004), mantendo o estado de conformação nativo da proteína Cl2, conforme se observa na Figura 6.

Estudos recentes indicam que metilaminas, tais como a sarcosina (Figura 7), presentes em peixes elasmobrânquios, músculos de anfíbios e até mesmo em células da medula renal de mamíferos, podem contrabalançar os efeitos deletérios da uréia na estabilidade e atividade de diversas proteínas e enzimas (BAGNASCO, 2000; IBARRA-MOLERO, *et al.*, 2000; WHITERS & GUPPY, 1996). Há trabalhos que relatam até mesmo efeitos favoráveis na formação de complexos enzima-substrato e enzima-cofator, na velocidade catalítica e estabilidade estrutural protéica de diversas macromoléculas (BOWLUS & SOMERO, 1979; BURG & PETERS, 1997; PRADEEP & UDGAONKAR, 2004; YOUXING, *et al.*, 1998), tomando como exemplo, as enzimas “aldose reductase” (BURG & PETERS, 1997) e a “fosfofrutoquinase”, presente em músculo de coelhos (HAND & SOMERO, 1982).

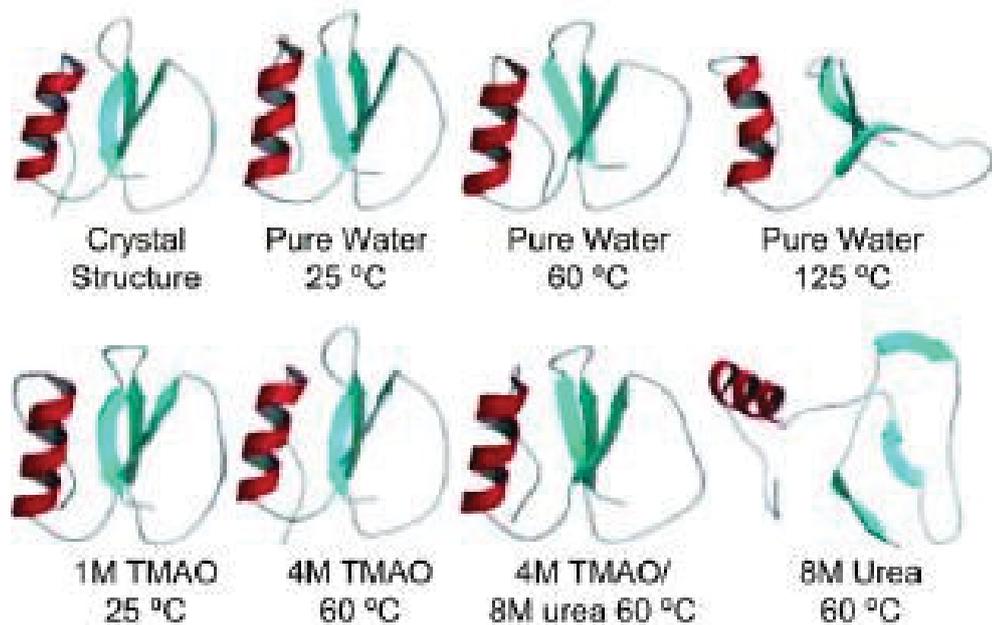


Figura 6 – Efeitos do TMAO sobre a estabilidade conformacional da proteína Cl2, frente à exposição à uréia ou a altas temperaturas. (BENNION E DAGGETT, 2004). Notar o desnovelamento causado pela exposição da proteína a 8 M de uréia, que é revertido quando se adiciona 4 M de TMAO.

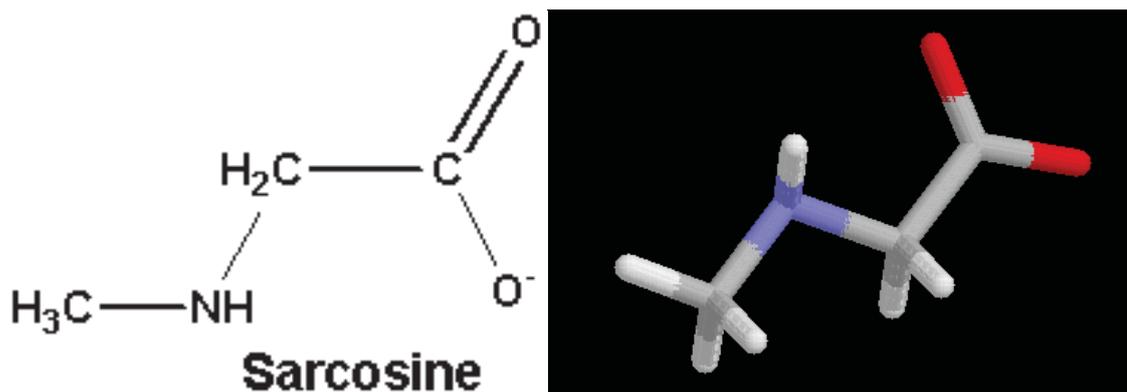


Figura 7: Estrutura química e esquema tridimensional da molécula de sarcosina.

Um exemplo extremo da importância dos osmólitos para os mamíferos está na medula renal, onde são encontradas concentrações de uréia de até 5.4 M, correspondendo a 30 % de uréia por massa tecidual. A sobrevivência das células da medula do rim só é possível graças à existência de osmólitos protetores, como as metilaminas, que contrabalançam os efeitos deletérios do sal e desnaturante da uréia (MACMILLEN & LEE, 1967; GARCIA-PEREZ & BURG, 1990).

A sarcosina tem demonstrado ser um eficiente osmólito, inclusive para embriões de arraia, devido às suas propriedades de estabilizar proteínas, bem como regular o volume celular. Esta metilamina também parece não interferir em vias metabólicas no interior da célula (STEELE, *et al.*, 2004). HORNER E MACKENZIE (1950) demonstraram que a sarcosina pode ser um metabólito presente na urina de ratos, sendo que aproximadamente 16 % da betaína ingerida na dieta é convertida em sarcosina, após 24 horas.

Outra importância fisiológica das metilaminas é sua contribuição para certos animais marinhos, como tubarões e arraias, flutuarem. Isso é possível devido ao acúmulo dessas substâncias, que apresentam menor densidade, quando comparadas a soluções eqüimolares da maioria dos outros solutos presentes em fluídos corporais (WHITERS, *et al.*, 1994). A sarcosina, o TMAO e a betaína desempenham um importante papel neste mecanismo, estando presente principalmente no interior de células musculares (Tabela 1) (WHITERS, *et al.*, 1994).

Dados obtidos em nosso laboratório demonstram que o TMAO é capaz de alterar a produção de força muscular, tanto em anfíbios quanto em mamíferos (ZAMPRONI & FOGAÇA, 2004). As figuras 8 e 9 demonstram as alterações na produção de força muscular observadas nesses experimentos.

Na figura 8, está computado o efeito do aumento da tonicidade, obtido com adição de TMAO ou sacarose (300 mM) à solução extracelular, sobre a produção de força em preparações de nervo frênico-músculo diafragma de ratos. Os dados revelam que o TMAO é capaz de aumentar em mais de 250 % a força máxima de contração, quando comparada à força obtida em preparações estimuladas eletricamente em meio isotônico. Ainda se observa um aumento significativo da contração basal de preparações expostas a este osmólito.

TABELA 1 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E INTRAMUSCULARES DOS PRINCIPAIS OSMÓLITOS PRESENTES EM TRÊS ESPÉCIES DE PEIXES ELASMOBRÂNQUEOS

Concentrações de solutos, no plasma e no interior de músculo estriado esquelético intacto de três espécies de peixes elasmobrânqueos. Os valores são expressos em $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

	<i>Furgaleus ventralis</i>	<i>Carcharhinus obscurus</i>	<i>Aptychotrema vincentiana</i>
Plasma			
Na ⁺	260	279	264
K ⁺	6.9	14.4	7.3
Cl ⁻	238	275	287
Ca ²⁺	4.2	3.4	3.6
Mg ²⁺	2.0	2.8	1.6
Urea	342	346	337
NH ₄ ⁺	0.74	0.70	0.70
TMAO*	70.0	75.4	71.1
TMA**	0.92	1.04	0.70
Músculo			
Na ⁺	39.3	40.8	33.6
K ⁺	97.7	106	98.2
Cl ⁻	31.7	43.0	28.7
Ca ²⁺	5.5	2.4	2.0
Mg ²⁺	1.09	0.92	5.28
Uréia	357	365	357
NH ₄ ⁺	4.2	3.9	3.6
TMAO	166	160	162
TMA	9.0	8.2	6.6
Betaína	56.8	15.8	56.9
Sarcosina	0.5	69	11.2

*TMAO: óxido de trimetilamina.

**TMA: trimetilamina.

Fonte: WHITERS, *et al.* (1994)

Efeitos do TMAO ou Sacarose (300 mM) na produção de força do músculo diafragma estimulado por via indireta

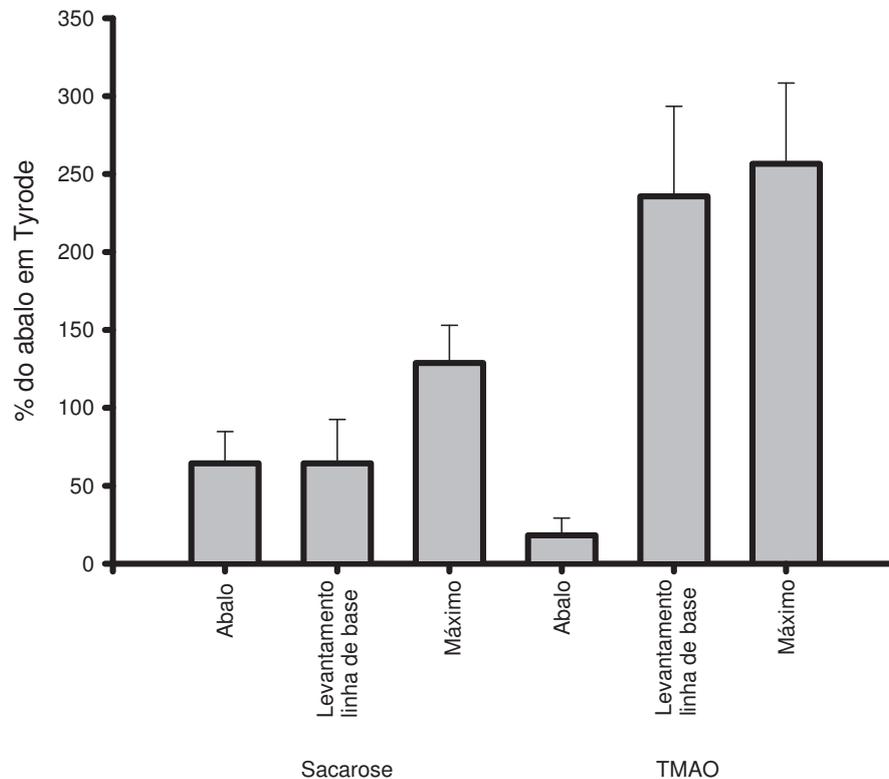


Figura 8 – Efeitos do TMAO ou sacarose (300 mM) no abalo, tensão basal, e produção máxima de força em preparações de nervo frênico-músculo diafragma de ratos. Os dados estão expressos em porcentagens dos valores obtidos com solução isotônica de Tyrode. Fonte: ZAMPRONI & FOGAÇA, 2004.

A figura 9 representa quantitativamente os efeitos do TMAO (100 mM) na produção de força induzida pela cafeína (2 mM), em células musculares esqueléticas polarizadas de anfíbio. A adição de TMAO potencializou a força de contração obtida pela cafeína, em aproximadamente 20 vezes. O mesmo efeito, porém não foi observado quando se aumentou a tonicidade com NaCl.

Efeitos do TMAO na força produzida por
cafeína (2 mM) em fibra muscular esquelética polarizada de anfíbi

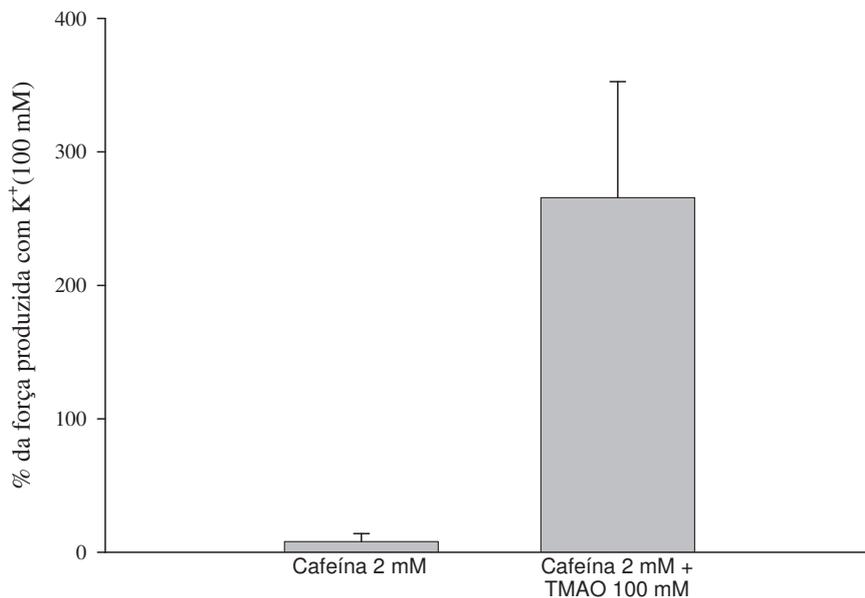


Figura 9 – Efeitos do TMAO (100 mM) na produção de força obtida com cafeína (2 mM) em músculo esquelético de rã. Os dados estão expressos em porcentagens em relação à contratura potássica, obtida em solução isotônica contendo alta concentração de K^+ (100 mM). Fonte: ZAMPRONI & FOGAÇA, 2004.

Estes dados demonstram que em células musculares, as alterações na osmolaridade do líquido extracelular podem afetar, pelo menos e não exclusivamente, dois processos: o de acoplamento excitação-contração e/ou o da contratilidade propriamente dita. Estas alterações podem provocar modificações na capacidade de produção de força das células musculares que poderão se refletir na capacidade de adaptação e/ou sobrevivência de animais submetidos a situações de estresse osmótico do meio. Resta saber se essas alterações na produção de força são decorrentes do simples aumento da tonicidade do meio, ou se o aumento de tonicidade obtido com diferentes osmólitos pode produzir diferentes efeitos sobre a produção de força.

Para responder a essa questão, desenvolveu-se esta pesquisa, que combinou diferentes técnicas de obtenção de contração muscular, para verificar o efeito da hipertonicidade na transmissão neuromuscular e no acoplamento excitação-contração de

músculo estriado esquelético mamíferos. Uma técnica que merece destaque é a de fibra muscular destituída de membrana celular. Esta técnica tem sido vastamente empregada com o objetivo de se estudar o processo de acoplamento excitação-contração, bem como o fenômeno da ativação do sistema contrátil (ZHU & NOSEK, 1992; GODT *et al.*, 1991; GODT *et al.*, 1993, LAMB, 2002). Esta técnica apresenta a vantagem de poder-se manter sob controle a composição química da solução que irá banhar o sistema tubular transversal, o retículo sarcoplasmático e o sistema contrátil. A remoção da membrana celular pode ser realizada mecanicamente, com o auxílio de pinças oftalmológicas (LAMB & STEPHENSON, 1990, LAMB *et al.*, 2000, LAMB *et al.* 2001). Pode também ser empregada a saponina e, neste caso, a permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática é abolida, pois este glicosídeo, reagindo com grupamentos de colesterol, promove a formação de poros os quais permitem a passagem de moléculas de alto peso molecular. Em ambos os casos, são preservadas a organização, a estrutura e a funcionalidade do sistema tubular transversal, retículo sarcoplasmático e do sistema contrátil (LAUNIKONIS & STEPHENSON, 1997). Com o emprego combinado de diferentes técnicas, como esta, e outras, utilizando a fibra intacta, é possível estudar os mecanismos que envolvem a transdução do sinal elétrico que provém dos receptores DHP presentes no sistema tubular transversal e dos receptores RyR do retículo sarcoplasmático, a liberação de cálcio induzida por cálcio, a captação de íons cálcio pelo retículo sarcoplasmático e a própria liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático.

2 - JUSTIFICATIVA

Um grande número de trabalhos existentes na literatura, e os dados experimentais obtidos em nosso laboratório (Ver figuras 8 e 9), têm demonstrado que alguns osmólitos de ocorrência natural, encontrados em altas concentrações, no meio intra e extracelular de diversos tecidos e organismos, são capazes de alterar a produção de força muscular, proteger proteínas em solução contra os efeitos deletérios da elevada força iônica, níveis reduzidos de pH ou altas temperaturas. O aumento da tonicidade extracelular, com conseqüente aumento da força iônica intracelular, pode ocasionar redução na produção da força muscular. O processo de acoplamento excitação-contração (AEC) é, provavelmente, uma das etapas afetadas por soluções de elevada tonicidade e força iônica (CAPUTO, 1968).

Contudo, os efeitos de soluções hipertônicas ajustadas com o osmólito de ocorrência natural, sarcosina, na transmissão neuromuscular e no AEC de mamíferos, não haviam sido investigados. Alguns animais estão sujeitos a variações extremas nas condições do meio em que vivem ou ainda apresentam situações fisiológicas e/ou patológicas causadoras de estresse osmótico em seu meio interno. Os ajustes da tonicidade intra e extracelular são obtidos utilizando-se esses osmólitos. Uma provável conseqüência desses fenômenos para o sistema muscular seriam alterações na produção de força por alterações no processo de transmissão neuromuscular ou no AEC.

Outra razão para o desenvolvimento deste trabalho foi a de investigar se a sarcosina e o TMAO são osmólitos compatíveis com os mamíferos, e se o tecido muscular esquelético destes animais, que não evoluiu na presença de concentrações substanciais deste osmólito, consegue manter sua funcionalidade quando exposto à soluções hipertônicas ajustadas com sarcosina ou TMAO. Alguns desses osmólitos possuem aplicações na biotecnologia, agricultura e medicina, porém pouco se sabe sobre a sarcosina (YANCEY, 2005). Assim, estudos que visem esclarecer os prováveis efeitos de osmólitos de ocorrência natural em processos fisiológicos, como na transmissão neuromuscular e no AEC, poderão fornecer importantes informações sobre a capacidade de adaptação animal bem como servir de base para a compreensão destes fenômenos fisiológicos.

3 - OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da sarcosina e do TMAO no processo de transmissão neuromuscular e no acoplamento excitação-contração de músculo estriado esquelético de mamíferos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos de soluções de diferentes tonicidades, ajustadas com sarcosina, na contratura induzida por 100 mM de potássio e na contratura cafeínica de músculo de mamífero;
- b) Investigar as conseqüências do aumento nos níveis de tonicidade da solução extracelular (ajustadas com sarcosina, TMAO ou sacarose), sobre a capacidade de produção de força de preparações musculares estimuladas diretamente (via eletrodos de platina colocados paralelamente às células musculares) ou indiretamente (estimulação do nervo motor);
- c) Averiguar os efeitos da variação brusca da tonicidade do meio, ajustada com sarcosina ou sacarose, sobre a produção de força do músculo esquelético, induzida por eletroestimulação neuromuscular;
- d) Investigar os efeitos de soluções de diferentes tonicidades (ajustadas com sarcosina ou sacarose) em preparações musculares que tiveram o sarcolema permeabilizado com o uso de saponina e estudar assim seus efeitos sobre o retículo sarcoplasmático;
- e) Verificar as variações no volume de células musculares incubadas em soluções hipertônicas ajustadas com sarcosina;
- f) Confrontar os dados referentes à produção de força muscular obtida em soluções hipertônicas ajustadas com sarcosina com àqueles obtidos com TMAO;
- g) Examinar se a sarcosina e o TMAO podem ser osmólitos compatíveis com a espécie estudada, em especial, o tecido muscular esquelético.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os equipamentos e materiais descritos a seguir estão instalados no Laboratório de Fisiologia da Contração Muscular, que conta com uma área física de aproximadamente 50 m², localizado no Departamento de Fisiologia, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná:

- Transdutor de força (e amplificadores), fabricado pela Scientific Instruments (G.M.B.H, Heidelberg, República Federal da Alemanha), com sensibilidade para registro de força produzido por uma única célula muscular;
- Sistema de câmaras móveis, construído em bloco de acrílico;
- Balança analítica;
- Potenciômetro para determinação de pH das soluções empregadas;
- Registradores potenciométricos (para registro da força de contração muscular);
- Bomba de circulação de água;
- Mesa com isolamento mecânico de vibrações, constituída de diferentes filtros mecânicos;
- Geladeira e congelador (-20 °C);
- Polígrafos (Beckmann e ECB);
- Computadores;
- Sistema de aquisição e análise de dados (Data Translation);
- Microscópio binocular;
- Estéreo microscópio;
- Transdutores de força isométrica (fabricado pela WPI);
- Gás com mistura carbogênica (mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂) – Air Products;
- Estimulador elétrico (GFE ISBM-04);
- Instrumental cirúrgico (tesouras e pinças nas dimensões padrão e oftalmológicas);
- Material cirúrgico auxiliar (algodão, gaze, esparadrapo, alfinetes, seringas);
- Éter Etílico, empregado para sacrificar o animal;
- Vidraria completa (beckers, pipetas, balões volumétricos, provetas, placas de Petri, etc);

- Reagentes e fármacos utilizados nas soluções (NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃, NaH₂PO₄, Glicose, Sarcosina, Sacarose, TMAO, Cafeína, d-Tubocurarina, Saponina, entre outros, vide detalhes na Tabela 4), bem como água destilada e água deionizada.
- Material de limpeza (álcool, papel toalha, detergente, esponja, etc.)

4.2 Métodos

O estudo foi realizado com células musculares de mamíferos, utilizando-se ratos Wistar adultos de ambos os sexos. O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas (Parecer nº 116/05). Os ratos foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas, e após terem sido anestesiados e sacrificados com emprego de éter etílico - (CH₃CH₂)₂O -, tiveram seus músculos diafragmas juntamente com o nervo frênico dissecados (Figura 10). O coto distal do nervo, medindo cerca de um centímetro de comprimento e a inserção muscular do nervo foram preservados. As preparações foram mantidas em solução nutritora de Tyrode (vide composição na Tabela 2), com pH 7,4 [ajustado com HCl (0,1N) ou com NaOH (0,1N)] e gaseificada com mistura carbogênica, composta de O₂ (95 %) e CO₂ (5 %). O aumento da tonicidade da solução de Tyrode foi obtido mediante a adição de sarcosina, ou de sacarose, a qual serviu como solução hipertônica controle.

A mensuração da osmolaridade de todas as soluções empregadas no trabalho foi realizada, empregando-se Osmômetro Wescor Vapro 5520, do Laboratório de Fisiologia Comparativa e da Osmorregulação, do Setor de Ciências Biológicas, desta Universidade.

4.2.1- Músculo intacto

As preparações neuromusculares foram colocadas em câmaras horizontais, contendo solução de Tyrode, mantidas a temperatura ambiente (22-26 °C) e gaseificadas, durante todo experimento, com mistura carbogênica. Feixes de células musculares diafragma de rato tiveram suas extremidades fixadas, através de seus tendões, uma a um micromanipulador e a outra a um transdutor de força. A produção de força foi obtida em condições isométricas (Figura 11). Antes da realização de qualquer procedimento experimental fez-se o ajuste do comprimento muscular com objetivo de se obter a melhor

relação força versus comprimento muscular. As respostas contráteis foram registradas em polígrafo (Beckmann Recorder, Figura 11). Na solução contendo alta concentração de KCl, este sal substituiu isosmoticamente o NaCl. As drogas (cafeína, d-tubocurarina) foram adicionadas diretamente à solução nutritora.

FIGURA 10 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E DISSECAÇÃO DE FEIXE MUSCULAR DE DIAFRAGMA DE RATO

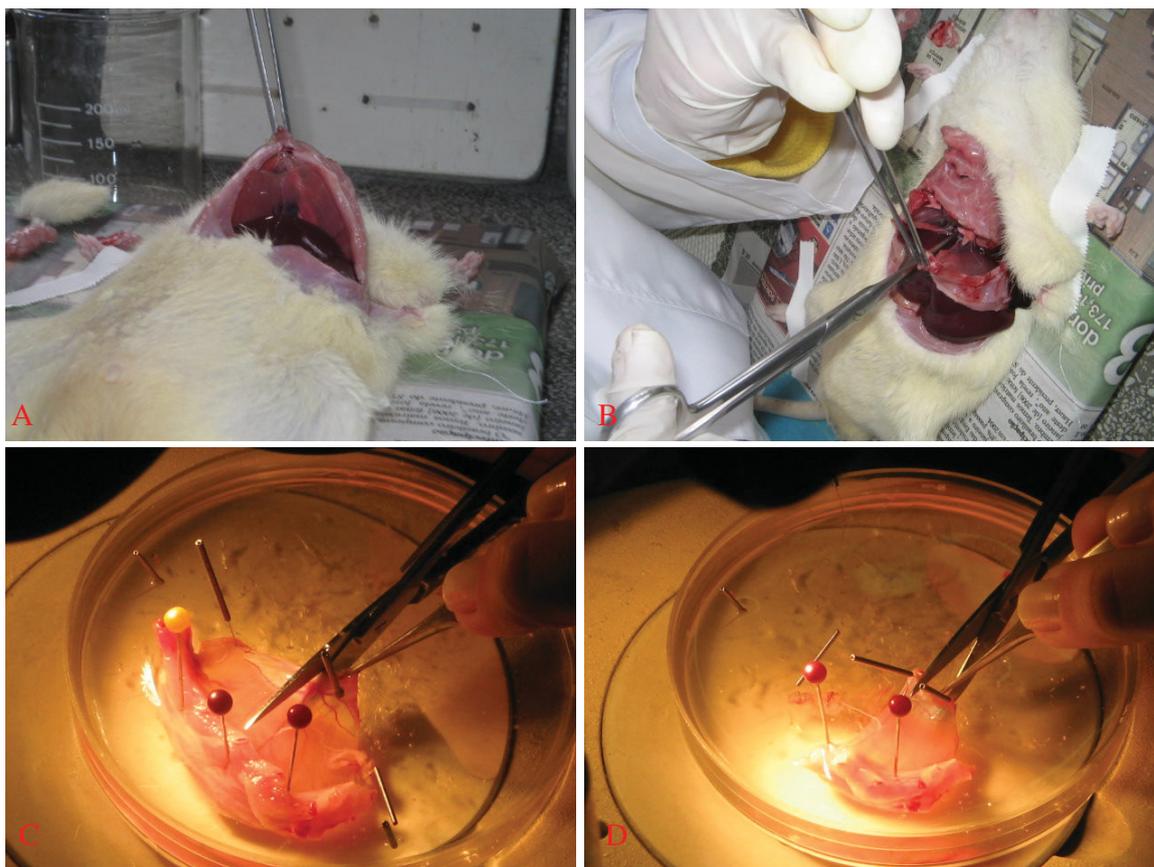


Figura 10 – Retirada cirúrgica do hemidiafragma de rato (topo, A e B), e dissecção de feixe de fibras musculares preservando-se as inserções tendíneas e do nervo frênico (abaixo, C e D).

Protocolo experimental:

- a) Contração muscular induzida por solução isotônica contendo 100 mM de potássio

Inicialmente os feixes de fibras foram mantidos por 20 minutos em solução de Tyrode, com tonicidade normal (isotônica). Nesta solução as fibras permanecem relaxadas. A seguir foram promovidas três contrações, através da imersão do músculo em soluções isotônicas contendo 100 mM de potássio (KCl 100 mM). Nestas condições, o músculo é despolarizado e produz uma contratura, que neste trabalho foi designada como contratura potássica, sendo esta usada como controle para todas as outras. O intervalo de tempo para relaxamento, entre cada uma destas contrações foi de 20 minutos, nos quais a preparação foi mantida em solução de Tyrode isotônico, com concentração de 5 mM de K^+ .

FIGURA 11 – ACOPLAMENTO DO FEIXE MUSCULAR AO SISTEMA DE AQUISIÇÃO E REGISTRO DE DADOS



Figura 11 – Detalhe da colocação do feixe muscular no sistema de ganchos composto por haste móvel e transdutor de força (A); câmara contendo o feixe muscular (círculo) e onde foram adicionadas os osmólitos testados, acoplado aos eletrodos (setas), que enviam o estímulo elétrico (B); visão geral do sistema de registro e aquisição de dados (C) e detalhe do registro gráfico das contrações musculares em polígrafo (D).

Em seguida, o feixe muscular foi submetido a soluções hipertônicas ajustadas com 50 mM de sacarose, permanecendo incubado por 20 minutos, e novamente despolarizado com 100 mM de K^+ , em meio contendo 50 mM de sacarose. Após lavagem em solução normal de Tyrode, permanecendo relaxado por 20 minutos, e nova contração controle, as fibras foram novamente incubadas em solução hipertônica, desta vez ajustada com 50 mM de sarcosina e despolarizadas com K^+ . Ao final, depois de 20 minutos em Tyrode Normal, mais uma contração potássica controle foi induzida e mensurada, com a finalidade de verificar se a resposta contrátil ao final do experimento era semelhante à do início. Os dados foram normalizados em relação à média das três contrações potássicas iniciais.

b) Contração muscular induzida por cafeína

Após obtenção de três contrações potássicas (em solução isotônica), o músculo isolado foi submetido à solução de Tyrode normal, contendo 3 mM de cafeína. Após a cafeína ter induzido a contração, e ter sido atingido o estado estacionário da força de contração, foi adicionado à solução 50 mM de sacarose ou 50 mM de sarcosina, na presença de cafeína. A cafeína é uma substância capaz de liberar cálcio do retículo sarcoplasmático. No entanto, nesta concentração (3 mM) é insuficiente para provocar a contração máxima e também não produz efeitos osmóticos. Isto nos permite observar a existência ou não de potencialização da contração cafeínica com a adição do osmólito.

c) Contração por estímulo elétrico indireto

Feixes de células musculares foram submetidos à estimulação elétrica supralimiar indireta, (estimulando-se o nervo frênico). Ajustaram-se os parâmetros de qualidade do estímulo (como duração do pulso e intensidade) até a obtenção da resposta contrátil máxima. Foram empregados pulsos quadrados, com intensidade de 2 a 15 Volts, duração de 1 ms e frequência de 0,5 Hz.

Primeiramente foi realizada a estimulação em solução isotônica de Tyrode, sendo a amplitude desta contração, tomada como controle. Sempre foram trocadas, por três vezes a solução de Tyrode, no início do experimento, verificando se a força de contração se mantinha constante com as simples trocas de solução. A seguir, foram adicionadas as concentrações crescentes de 5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM de sacarose, TMAO ou

sarcosina acrescentadas ao Tyrode. Alguns experimentos foram realizados adicionando-se sacarose ou sarcosina (300 mM) à solução de Tyrode isotônico, com o objetivo de se verificar as conseqüências do aumento abrupto da tonicidade na capacidade de produção de força.

d) Contração por estímulo elétrico direto

Neste protocolo, as células musculares foram estimuladas eletricamente, com uma frequência de 0,5 Hz, pulsos quadrados, com duração de pulso de 1 ms e intensidade de estímulo supralimiar. A contração do músculo diafragma foi obtida de forma direta, mediante eletrodos de platina posicionados paralelamente ao feixe muscular. O roteiro metodológico foi semelhante ao anterior, a saber: após ter sido obtida a amplitude de contração controle, foram avaliados os efeitos da adição de concentrações crescentes de sacarose, TMAO ou sarcosina (5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM) à solução de Tyrode. Também foi realizada a exposição súbita das preparações à sacarose ou sarcosina (300 mM). Para bloquear a transmissão neuromuscular, durante todo o experimento foi adicionado à solução nutritora, d-tubocurarina (10^{-5} g/ml).

4.2.2 - Fibra muscular desmembranada com o uso de saponina

Para este protocolo foi utilizado o músculo ílio-psoas de ratos. Este músculo possui menos tecido conjuntivo que o diafragma, o que facilita sua dissecação. A técnica consiste na retirada do músculo, e com o uso de pinças oftalmológicas, a dissecação de um conjunto de 1 a no máximo 5 fibras musculares. A figura 12 mostra o aparato empregado na realização destes experimentos. Tal aparato consistiu em um sistema de câmaras que continham as diferentes soluções empregadas durante o experimento, um transdutor de força, um polígrafo, responsável pelo registro das contrações musculares, e ainda um microscópio óptico empregado para visualização e manipulação das fibras.

Após sua dissecação o feixe de células musculares foi transferido para uma câmara contendo uma solução relaxante (R) – (composição descrita na Tabela 3) e mantidas por 40 minutos, na presença de 60 µg/ml de saponina. A saponina é um agente que interage com as moléculas de colesterol da membrana plasmática, deixando a membrana mais permeável a substâncias que estão no meio extracelular (Launikonis &

Stephenson, 1997). As fibras musculares tiveram então uma de suas extremidades fixadas a um transdutor de força (Scientific Instruments G.M.B.H, Heidelberg, Alemanha), mantido em posição estacionária e a outra ajustada a um braço móvel. As amplitudes de contração foram registradas num polígrafo. Um conjunto de câmaras contendo diferentes soluções construídas num bloco de acrílico móvel permitiu que a fibra muscular fosse submetida a diferentes protocolos experimentais (Figura 12) (FOGAÇA *et al.*, 1997; BRENNER, 1986). A seqüência de passagens das fibras musculares pelas diferentes soluções empregadas neste estudo estão esquematizadas na figura 13.

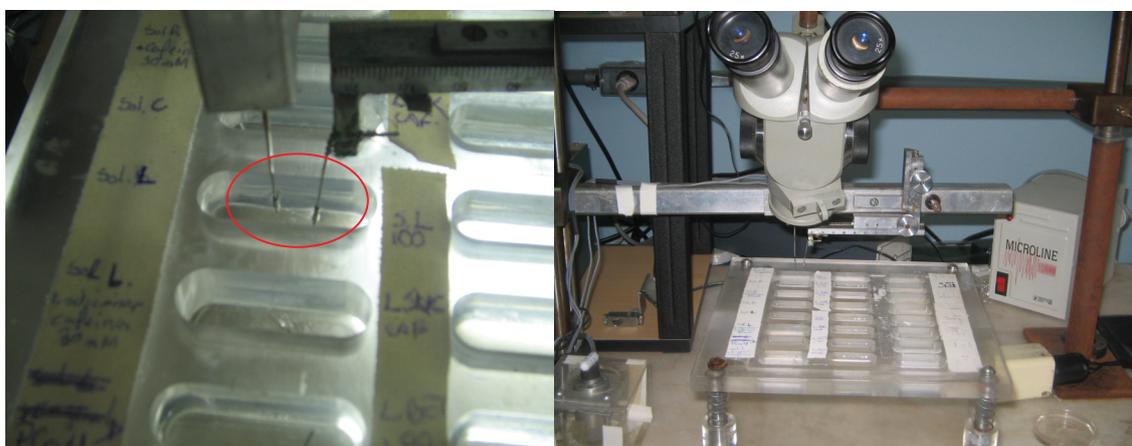


Figura 12 - Imagem da câmara acrílica contendo as diferentes soluções empregadas no protocolo de fibra permeabilizada, bem como a fibra muscular presa em uma de suas extremidades a uma haste móvel e a outra extremidade ao transdutor de força, no detalhe.

Inicialmente a fibra muscular foi mergulhada em uma solução contendo pCa 4.0, com o objetivo de verificar se o sistema contrátil estava funcionando, e quantificar a produção máxima de força. A seguir a fibra foi transferida para a solução R durante 1 minuto para então ser mergulhada na solução R, a qual adicionou-se cafeína (30 mM), com a finalidade de se promover a depleção de íons cálcio do RS.

Com a finalidade de se realizar o carregamento com íons cálcio, a fibra muscular foi transferida para uma solução contendo 1×10^{-6} M deste íon (solução C). A seguir a fibra muscular foi transferida para a solução R com a finalidade de se realizar a retirada dos íons cálcio presentes no espaço das miofibrilas. Na seqüência, a fibra muscular foi

transferida para a solução L a qual apresenta baixa concentração de EGTA (0,05 mM). A imersão da fibra nesta solução tem como finalidade reduzir a capacidade de tamponamento dos íons cálcio no interior das miofibrila. Desta forma a ativação do sistema contrátil fornecerá um índice da quantidade de íons cálcio liberado pelo RS. A liberação deste íon será obtida mediante a exposição das preparações a solução L, na qual adicionou-se cafeína. Como nesta solução a capacidade de tamponamento dos íons cálcio é reduzida pela baixa presença de EGTA na solução, isto permite que todo o cálcio liberado do retículo sarcoplasmático venha única e tão somente ativar o sistema contrátil. A contração muscular assim obtida forneceu um índice apropriado da quantidade de cálcio liberada do retículo sarcoplasmático.

Após a obtenção da contratatura cafeínica máxima, a preparação foi transferida para uma câmara contendo solução R, para relaxar, e novamente transferida para a solução C, para carregar o retículo com cálcio. Em seguida foi transferida à solução L, desta vez com adição de 3 mM de cafeína. Como esta concentração de cafeína produz uma contração submáxima, foi possível verificar o efeito da adição dos osmólitos à esta preparação.

Com o intuito de se avaliar o efeito da sarcosina, idêntico protocolo foi realizado, acrescentando-se, estes compostos na solução L. Foram realizados experimentos em diferentes concentrações (50 e 100 mM) e a contração cafeínica foi utilizada como controle. Ao final do experimento, nova contratatura cafeínica (3 mM) foi realizada para verificar se o grau de contração era o mesmo do início do experimento.

4.2.3 – Massa celular

Para verificar os efeitos da sarcosina no teor hídrico celular, foi avaliada a variação da massa de células musculares incubadas com este osmólito. Para isso, foram empregados feixes de células musculares intactas de diafragma, as quais foram previamente pesadas, e então submetidas às soluções hipertônicas de Tyrode, contendo sacarose ou sarcosina (50 mM). As células musculares foram pesadas nos instantes 0, 3, 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 minutos de incubação na solução contendo o osmólito e, nos mesmos intervalos de tempo após o retorno das preparações à solução isotônica de Tyrode.

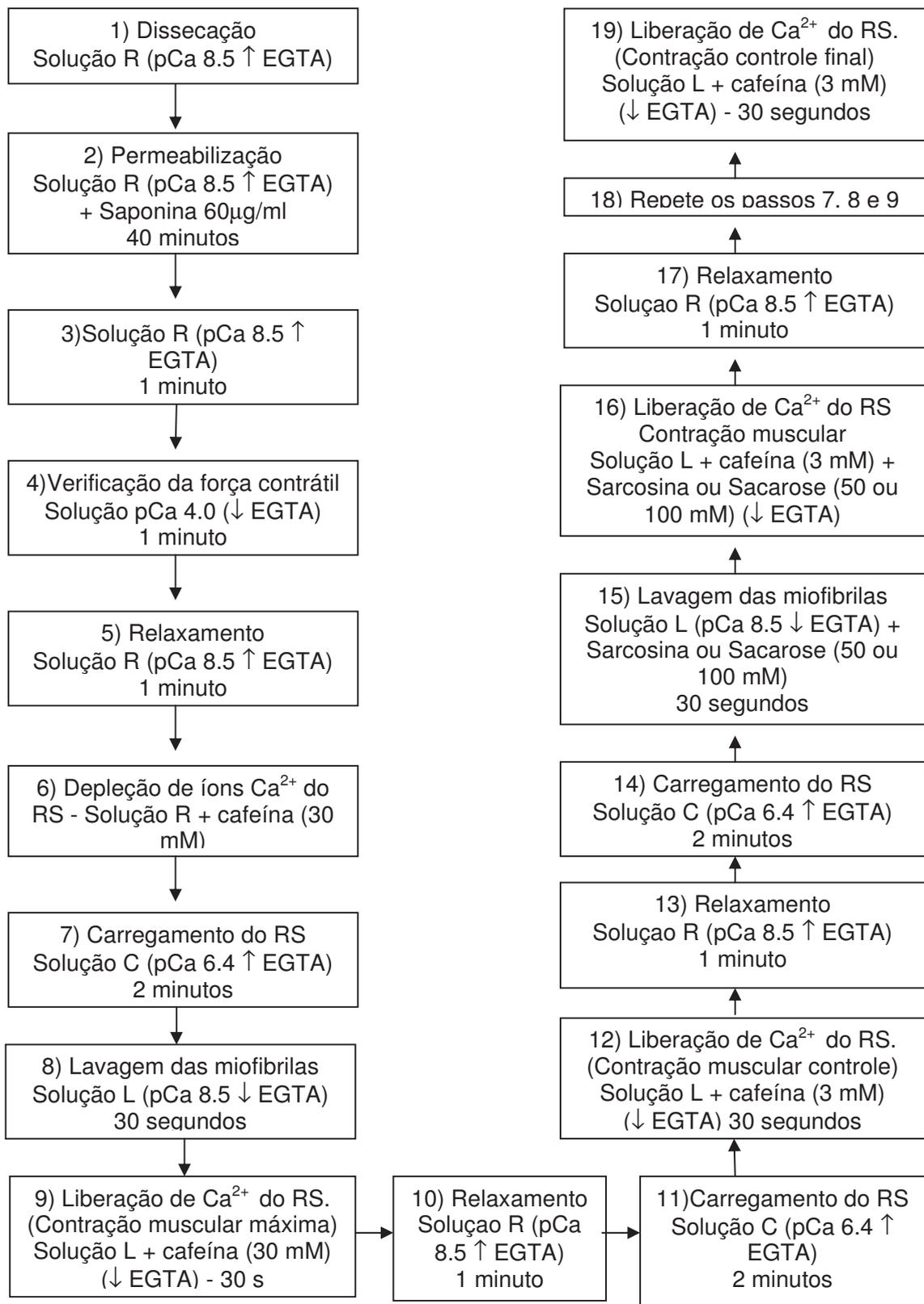


Figura 13 – Protocolo experimental de fibra permeabilizada com saponina

4.3 - Composição das soluções empregadas neste estudo

Para os experimentos realizados com fibra intacta foi utilizada a solução nutritora Tyrode, que mimetiza o meio extracelular de mamíferos. Para as soluções empregadas em fibras permeabilizadas foi necessário realizar o cálculo da composição das soluções. Para tanto, foi utilizado um programa de computador escrito na linguagem Turbo Pascal que descreve as múltiplas constantes de equilíbrio de íons em solução usando constantes de associação previamente publicadas (GODT & LINDLEY, 1982; ANDREWS *et al.*, 1991). As tabelas 2 e 3 demonstram a composição das soluções a serem empregadas neste estudo.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO TYRODE

Composto	Concentração (mM)
NaCl	136
KCl	5
MgCl ₂	0,98
CaCl ₂	2
NaH ₂ PO ₄	0,36
NaHCO ₃	11,9
Glicose	5,5
pH	7
Osmolaridade	300 mOsm/l

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS SOLUÇÕES EMPREGADAS EM EXPERIMENTOS DE FIBRAS DESMEMBRADAS COM O USO DE SAPONINA

	Solução A	Solução R	Solução C	Solução L
Mg ²⁺	1	1	1	0,1
MgATP	2	2	2	2
Fosfocreatina	15	15	15	15
EGTA	5	5	5	0,05
BES	50	50	50	50
pCa: (-log[Ca ²⁺])	8,5-4,0	8,5	6,4	8,5
Creatina kinase*	0,25	0,25	0,25	0,25
Força iônica	200	200	200	200
pH	7	7	7	7

As concentrações e a força iônica estão expressas em mM, exceto quando indicado. A força iônica das soluções foi ajustada com metanosulfonato de potássio (KMSO₃).

* mg/ml

4.3.1 – Reagentes empregados

A tabela 4 sumariza os reagentes empregados no estudo, bem como a marca fabricante e o lote de fabricação.

TABELA 4 – REAGENTES EMPREGADOS, FABRICANTE E LOTE DE FABRICAÇÃO

Reagente	Fabricante	Lote de Fabricação
NaCl	Merck	1064041000
KCl	Vetec	950526
MgCl ₂	Sigma	125H1183
CaCl ₂	Riedel	12064
NaH ₂ PO ₄	Riedel	411135-53

NaHCO ₃	Merck	52S37
Glicose	LabSynth	16372
Sacarose	Carlo Erbs	21398
Sarcosina	Sigma	117F-08444
TMAO	Sigma	092K3665

4.4 – Análise Estatística

O número da amostra (n) variou de 5 a 10, dependendo do experimento. Na maioria dos protocolos experimentais, os dados obtidos com sarcosina quando comparados à sacarose, foram analisados através do Teste – T de Student para dados pareados, uma vez que se utilizou a mesma amostra de tecido muscular. A exceção é o protocolo de contratura cafeínica, onde foram utilizadas diferentes amostras de músculo para testar os efeitos de sarcosina e sacarose, visto que a cafeína produz uma contratura irreversível. Neste grupo de experimentos, foi aplicado o teste de Mann-Whitney Rank, para dados não pareados. Para comparar mais de dois resultados, como no caso dos experimentos com adição abrupta de alta concentração de solutos, onde foram analisados diversos parâmetros, utilizou-se ANOVA, e para comparação dos contrastes, “a posteriori”, utilizou-se o Teste de Tukey Os dados estão expressos em percentual \pm o erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1 Contratura potássica

No experimento de contratura potássica, foi avaliada a produção de força muscular em células de diafragma de rato, expostas às concentrações de 50 mM de sacarose ou sarcosina, previamente incubadas em Tyrode normal e adicionadas à solução isotônica de Tyrode contendo 100 mM de KCl. A figura 14 mostra os registros originais obtidos durante este experimento. Inicialmente foram feitas as contraturas potássicas controle, para a seguir, testar-se os efeitos da adição dos osmólitos sobre a produção de força.

Conforme se observa na figura 15, tanto sacarose quanto sarcosina potencializaram a contratura potássica controle. Os valores de força (em valores percentuais da contratura potássica controle), foram para a sacarose e a sarcosina, respectivamente de, $191,81 \pm 17,28$ % e $246,90 \pm 26,82$ %. Os valores apresentam uma diferença estatisticamente significativa não só entre si (sacarose e sarcosina), como em relação à solução controle isotônica. Tal resultado demonstra que o aumento da tonicidade obtido com sarcosina foi capaz de potencializar a contratura potássica, em um maior grau do que aquele obtido com sacarose. Tanto sacarose quanto sarcosina produziram uma contratura “per se” quando adicionadas à solução de Tyrode Normal. Para a sarcosina, a contratura “per se” foi de $51,79 \pm 19,15$ % da contratura potássica, enquanto para a sacarose foi de $13,88 \pm 13,88$ %. Estes valores também diferem significativamente, evidenciando que a sarcosina foi capaz de manter um estado de contração parcial do músculo, estando imerso em uma solução relaxante, neste caso, o Tyrode Normal.

Também foi analisado o grau de recuperação da célula muscular ao final do experimento, pela indução de uma última contração potássica realizada no final. O músculo apresentou uma excelente recuperação, perfazendo $96,52 \pm 12,14$ % de força em relação à média das contrações potássicas iniciais. Este dado revela que mesmo após a exposição das células às soluções hipertônicas, a contração muscular continua eficiente, sugerindo que tanto sarcosina quanto sacarose, nestas concentrações, não possuem um efeito deletério sobre o mecanismo de produção de força.

5.2 Contratura cafeínica

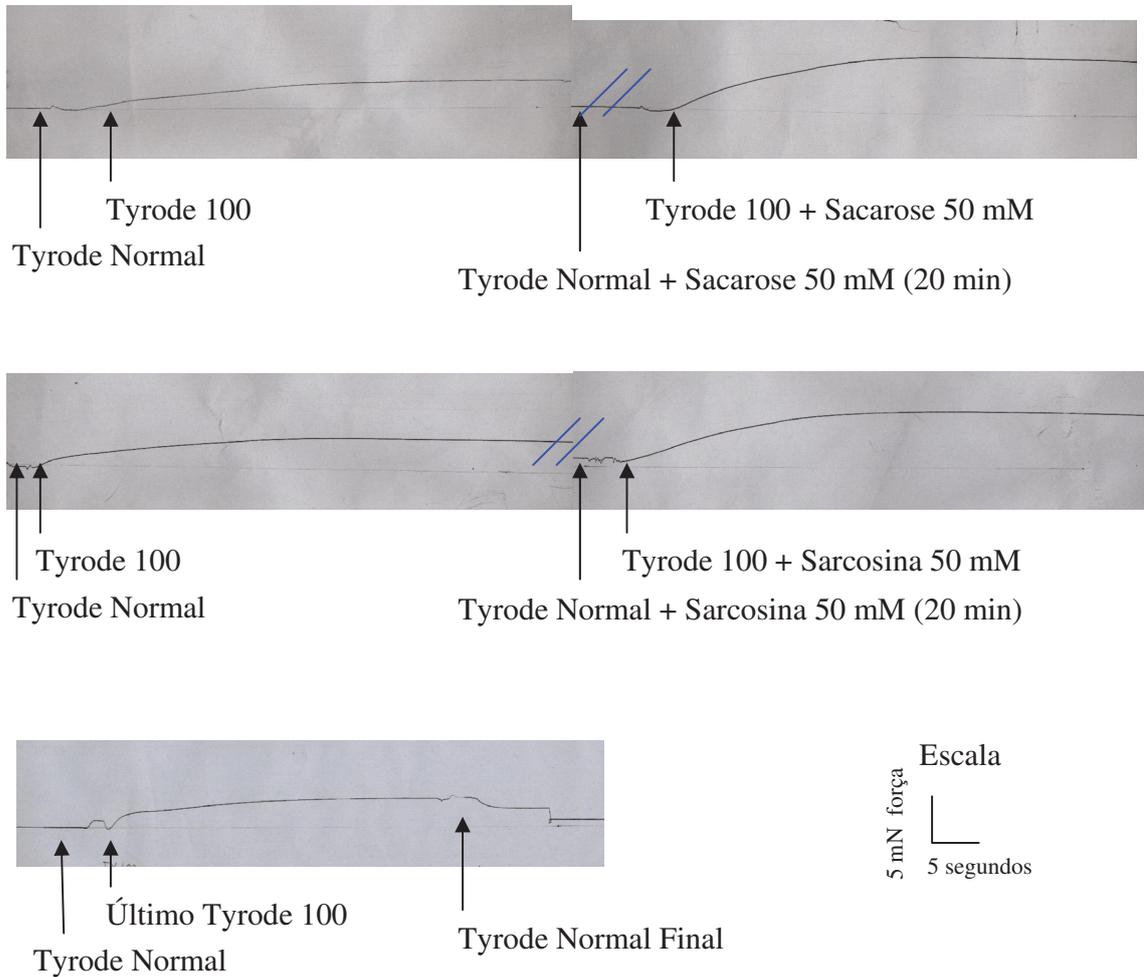


Figura 14 - Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo de uma preparação induzida por contratura potássica, na ausência e na presença de sacarose ou sarcosina (50 mM). No registro superior, observa-se uma contratura potássica controle e outra obtida na presença de sacarose. No registro do meio, encontra-se uma contratura potássica controle e outra na presença de sarcosina. A última contratura potássica, realizada ao final do experimento, está no registro inferior. As linhas azuis indicam intervalos de 20 minutos na aquisição dos dados, tempo necessário para o relaxamento completo do feixe entre uma contratura e outra.

EFEITOS DA SACAROSE OU SARCOSINA NA PRODUÇÃO DE FORÇA INDUZIDA
POR 100 mM DE K⁺ DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO

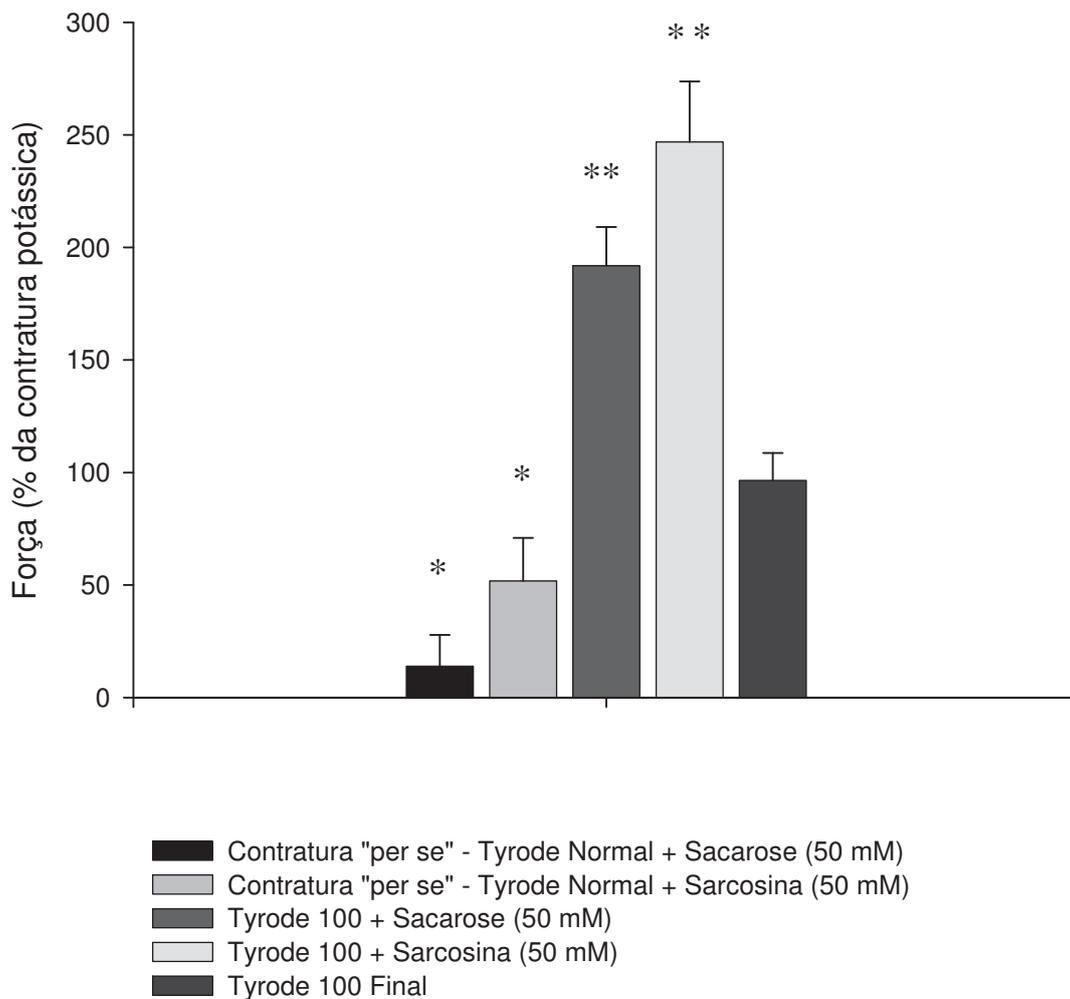


FIGURA 15 – Representação gráfica da produção de força de músculo diafragma de rato induzida por sarcosina ou sacarose (50 mM) em Tyrode Normal ou contendo 100 mM de K⁺. Os dados estão expressos em porcentagem de força em relação à contração potássica controle, obtida com Tyrode isotônico contendo 100 mM de KCl e representam a média ± erro padrão (n = 6). (* e ** indicam diferença estatística entre si)

No experimento de contração induzida pela cafeína (3 mM), foi possível observar-se que a sacarose e sarcosina promoveram uma potencialização da mesma. A figura 16 é um registro original deste experimento. Na seção “D” desta figura é possível observar o pico de força induzida por cafeína na presença de sacarose (50 mM).

A figura 17 demonstra os valores da contratura cafeínica em relação à contratura potássica controle, na presença ou ausência de sacarose ou sarcosina. Considerando a contratura potássica como sendo 100 %, a média das contraturas cafeínicas foi de $30,91 \pm 10,94$ % da média das contraturas potássicas. Adicionando sarcosina ou sacarose, a contração foi respectivamente de $51,33 \pm 18,16$ % e $73,01 \pm 18,04$ % da contratura potássica.

A figura 18 representa os dados de força muscular induzida pela cafeína na presença dos osmólitos. Os dados são expressos em porcentagem da contratura obtida com cafeína (3 mM). A produção de força obtida na presença de 50 mM de sarcosina ou sacarose corresponde respectivamente a $192,67 \pm 39,34$ % e $271,36 \pm 66,99$ % da contratura obtida apenas com cafeína. Com adição de sarcosina ou sacarose à cafeína, percebeu-se um aumento na contratura cafeínica, porém não existe diferença estatística entre a potencialização obtida com sacarose daquela obtida com sarcosina.

5.3 Contração muscular produzida por estimulação elétrica indireta

As figuras 19 e 20 são registros originais obtidos mediante estimulação elétrica indireta do músculo diafragma de rato. A figura 19 demonstra o efeito da adição de diferentes concentrações de sacarose sobre a produção de força, enquanto a figura 20 mostra o efeito da adição de sarcosina. As figuras 21 e 22 representam graficamente os valores médios de produção força, obtidos mediante este tipo de estimulação. Os dados são expressos em porcentagem de força em relação à contração controle, obtida em solução nutritiva isotônica de Tyrode.

A figura 21 mostra a amplitude das contrações musculares obtidas com baixas concentrações (5, 10 e 50 mM) de sacarose ou sarcosina. A figura 22 refere-se a variação percentual de força muscular em diferentes soluções, contendo altas concentrações (100, 200 e 300 mM) de sacarose ou sarcosina. Analisando-se os dados, é possível observar que soluções hipertônicas obtidas com sarcosina são capazes de preservar grande parte da força de contração, até uma determinada concentração deste osmólito. O mesmo não ocorre com sacarose.

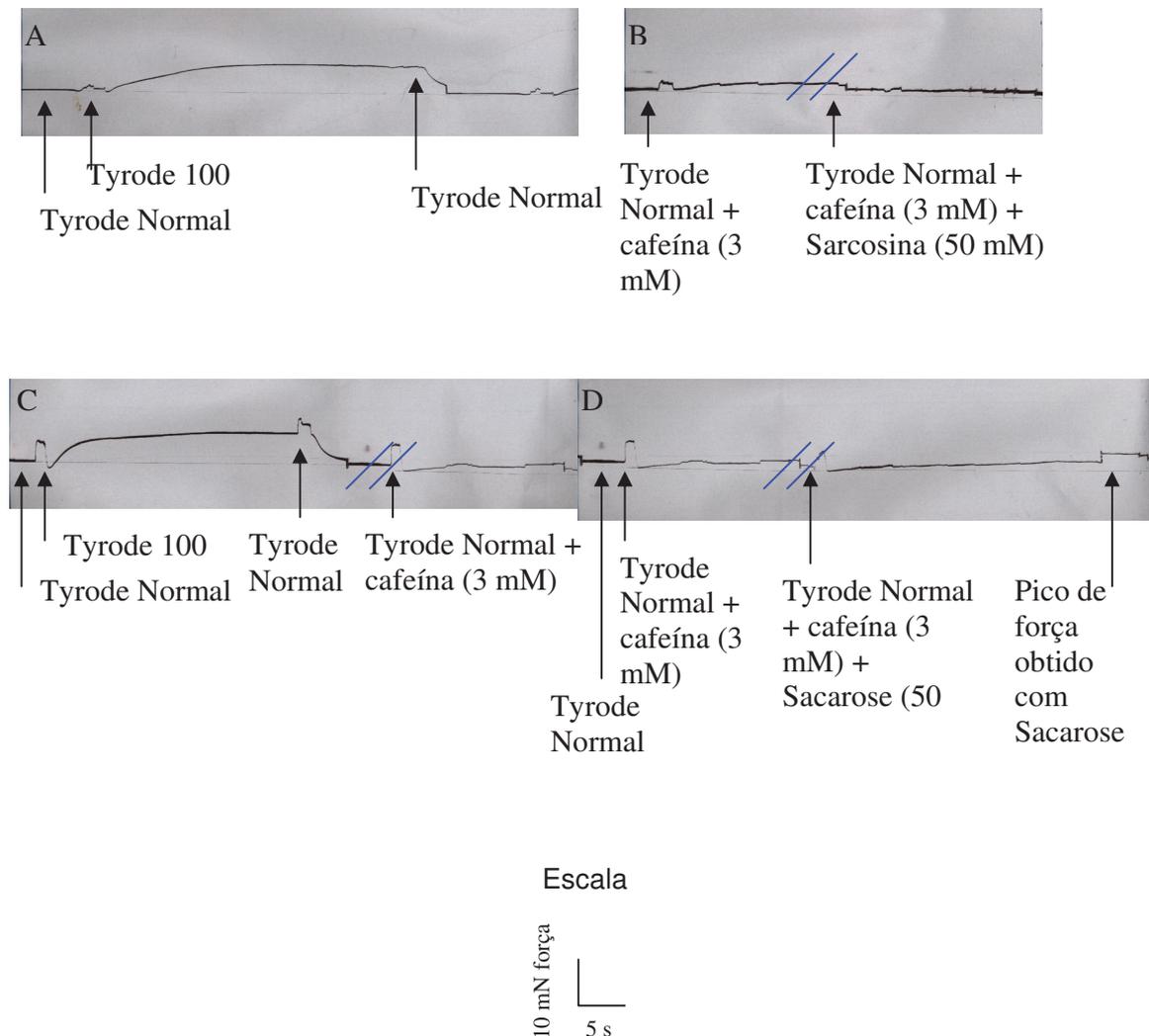


Figura 16 - Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo de uma preparação estimulada por contração cafeínica na ausência e na presença de sacarose ou sarcosina (50 mM). Após três contrações potássicas controles iniciais (mostrada apenas uma delas em "A" e outra em "C"), a preparação foi mantida em Tyrode normal, durante 20 minutos. Em seguida foi adicionado 3 mM de cafeína, até obter-se o estado máximo de contração muscular (B e D). A seguir, adicionou-se 50 mM de sarcosina (B) ou sacarose (D) mantendo-se por um tempo variável, entre 30 e 40 minutos, até atingir o estado máximo de contração. As setas azuis indicam intervalos na aquisição dos dados, tempo necessário para o relaxamento completo do feixe entre uma contração e outra (C) ou para atingir o máximo de contração (B e D).

EFEITOS DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS NA CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA
PELA CAFEÍNA (3 mM) EM RELAÇÃO À CONTRATURA POTÁSSICA

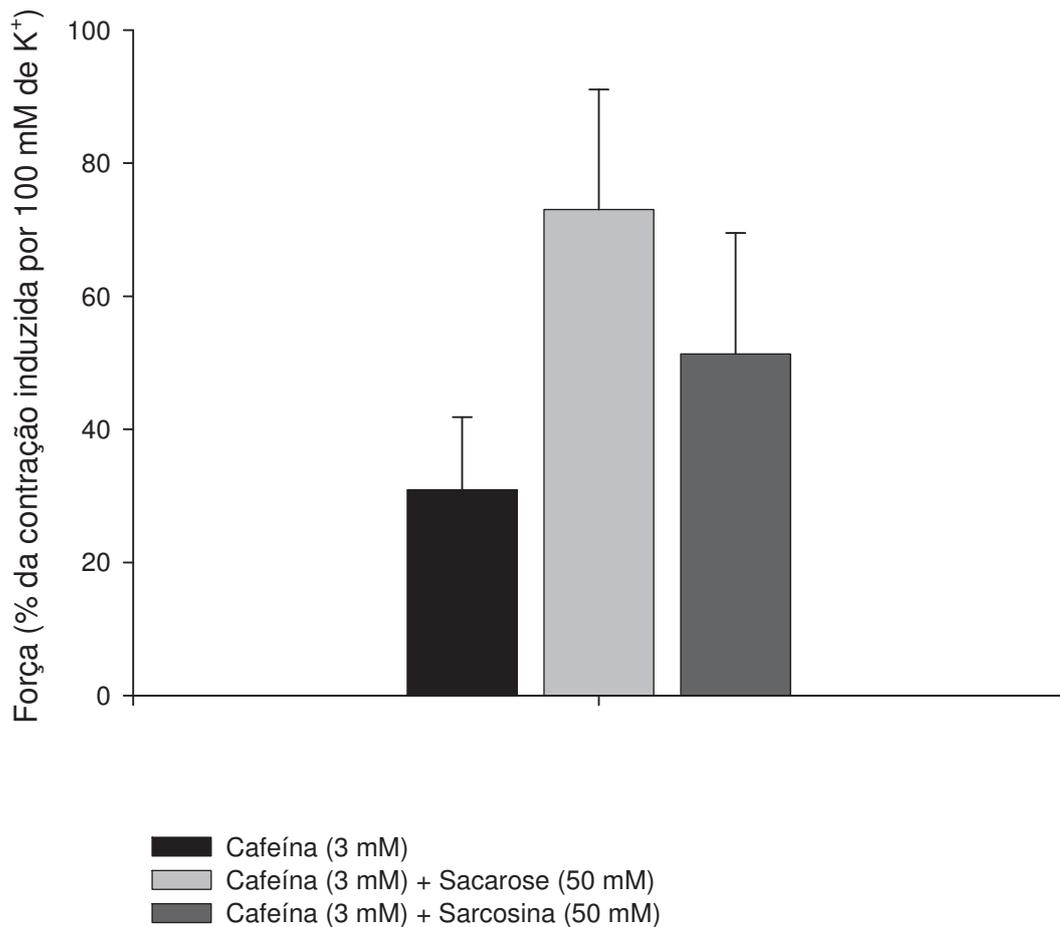


Figura 17 – Representação gráfica dos dados de produção de força do músculo diafragma de rato induzida por cafeína (3 mM), na presença ou ausência de sacarose ou sarcosina (50 mM). Os dados estão normalizados e expressos em valores percentuais àqueles obtidos em solução de Tyrode contendo 100 mM de potássio e representam a média \pm erro padrão (n=7).

EFEITOS DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS NA CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA PELA CAFEÍNA (3 mM) EM RELAÇÃO À CONTRATURA CAFEÍNICA (3 mM)

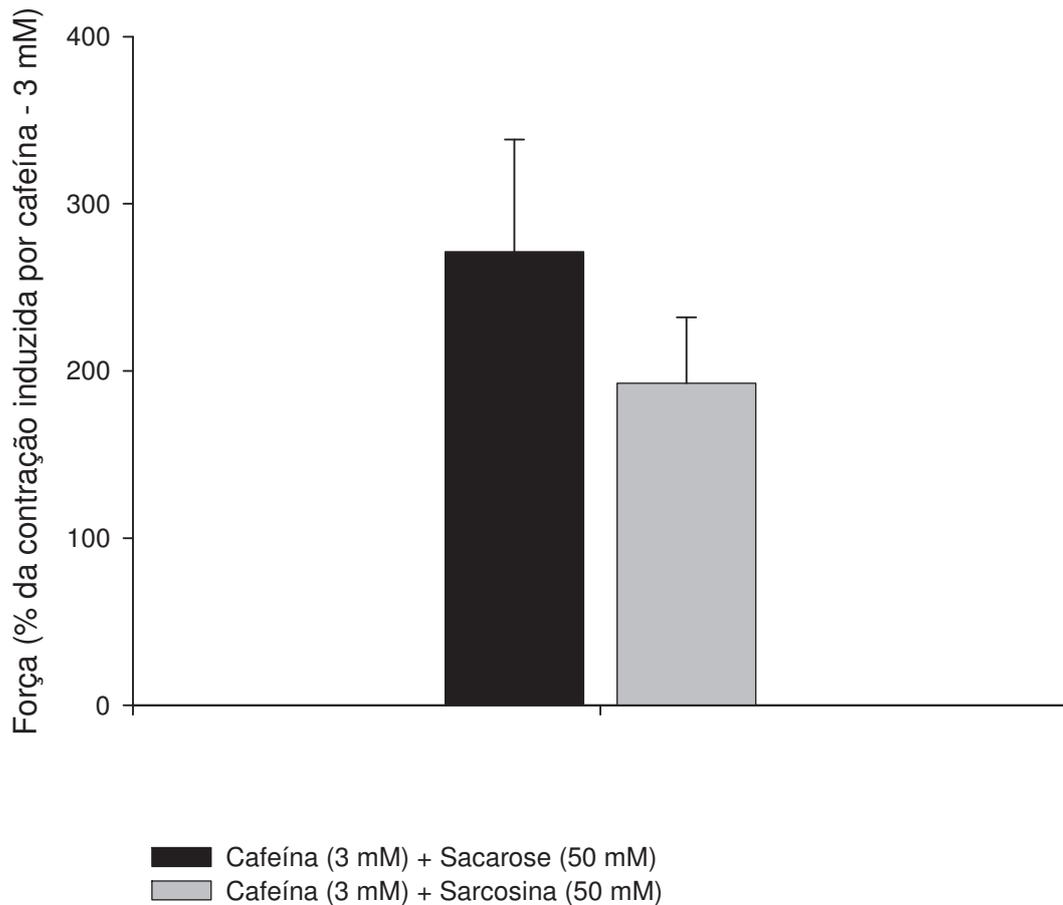


Figura 18 – Representação gráfica dos dados de produção de força do músculo diafragma de rato induzida por cafeína (3 mM), na presença de sacarose ou sarcosina (50 mM). Os dados expressos com a média \pm o erro padrão, estão normalizados em valores percentuais àqueles obtidos com a contratura cafeínica (3 mM). (n = 7)

Ao adicionar-se sarcosina (5 mM), a força produzida foi de $106,93 \pm 10,20$ % do controle. Nesta concentração, a sacarose reduziu a força de contração para $81,65 \pm 4,47$ % dos valores obtidos no controle. Essas diferenças são estatisticamente significativas. À medida que a tonicidade da solução foi aumentada, a produção de força diminuiu. Com aumento da tonicidade em 100 mM, a contração obtida com sacarose foi de $72,02 \pm 9,18$ % da contração controle, enquanto que com sarcosina, foi de $76,23 \pm 11,96$ %. A partir desta concentração, a produção de força diminuiu ainda mais, à medida que a concentração do meio aumentou, não havendo diferença significativa entre a produção de força obtida na presença de sacarose ou sarcosina. A inibição da força de contração foi total quando as concentrações de sacarose ou sarcosina alcançaram 300 mM.

As figuras 23 e 24 representam os experimentos de exposição súbita de feixes de células de diafragma, a 300 mM de sarcosina ou sacarose, a partir de uma solução de Tyrode isotônica. A figura 23 contém um registro original deste experimento, enquanto a figura 24 contém os valores percentuais referentes ao nível basal de contração, abalo, e amplitude máxima de contração. O nível basal de contração refere-se ao nível máximo de relaxamento que o músculo alcança. O nível basal de relaxamento alterou-se em alguns experimentos, demonstrando uma alteração no nível máximo de relaxamento do músculo. Isto indica que o músculo não atingiu seu estado de relaxamento completo, permanecendo parcialmente contraído. Ambos os solutos produziram deslocamento neste nível basal, porém em proporções diferentes. Para sarcosina, o aumento no nível basal de força foi de $19,64 \pm 5,80$ %, enquanto para sacarose foi de $62,78 \pm 27,06$ % do abalo em Tyrode isotônico. Entende-se por abalo, a amplitude de contração produzida pelo músculo, a partir de seu nível basal de força, até seu pico de contração. Para ambos os solutos testados, este quesito diminuiu drasticamente, indo para aproximadamente 6 % da amplitude de contração muscular obtida em solução isotônica. Já a amplitude máxima de contração é a soma do abalo com o nível basal de contração, fornecendo o ápice de contração desenvolvido pelo músculo. Para sarcosina, a amplitude máxima registrada foi de $26,39 \pm 6,44$ % da contração controle, enquanto para sacarose foi de $69,60 \pm 27,84$ %. A amplitude máxima da contração foi maior para sacarose em consequência desta ter manifestado o maior aumento em nível de tensão basal. Entretanto, para os três parâmetros analisados, não existe diferença estatística significativa entre sarcosina e sacarose, sugerindo apenas um efeito do aumento da tonicidade, e não um efeito específico do osmólito empregado.

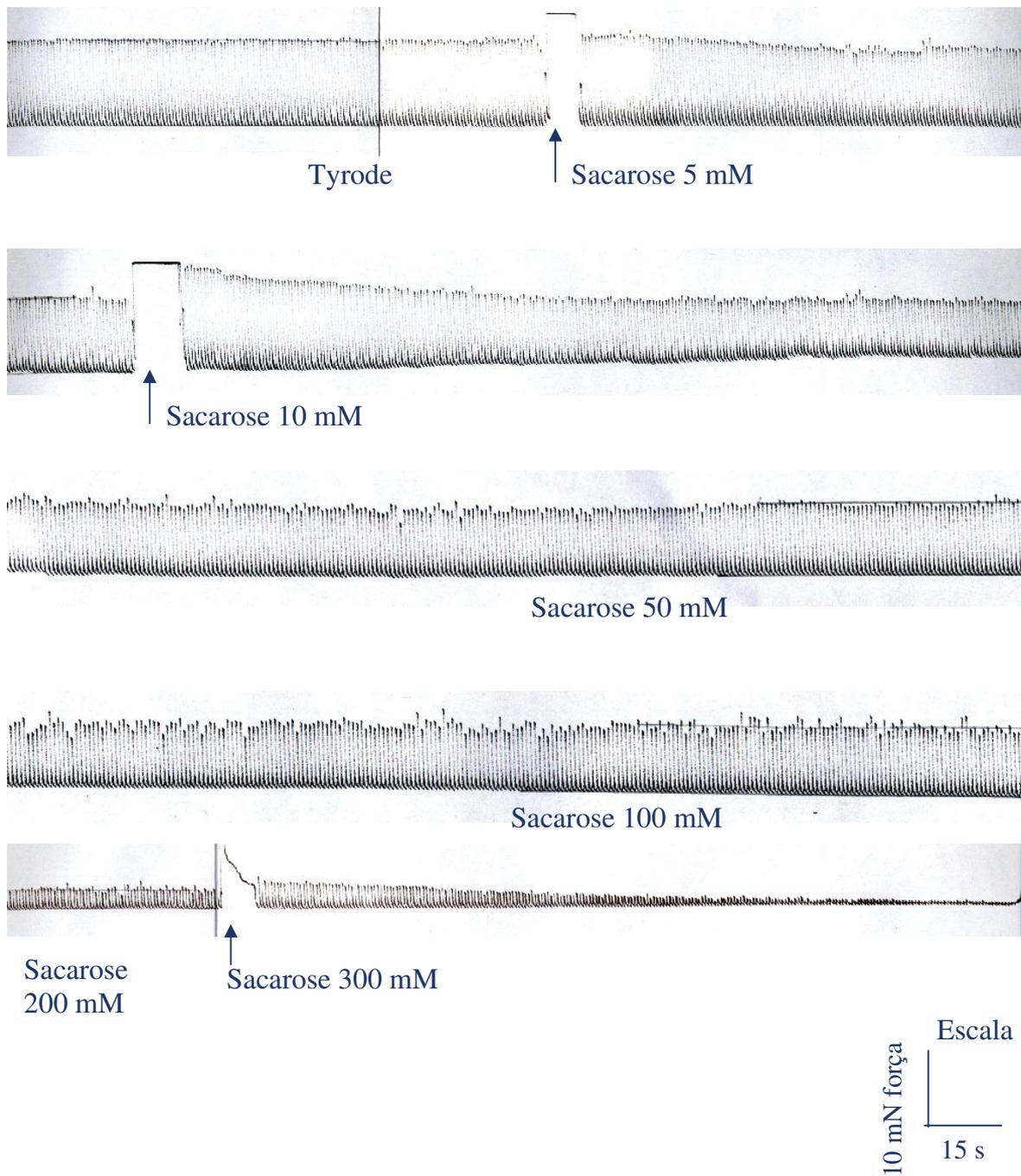


Figura 19 - Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo de uma preparação de músculo diafragma de rato estimulada indiretamente na ausência e na presença de concentrações crescentes de sacarose.

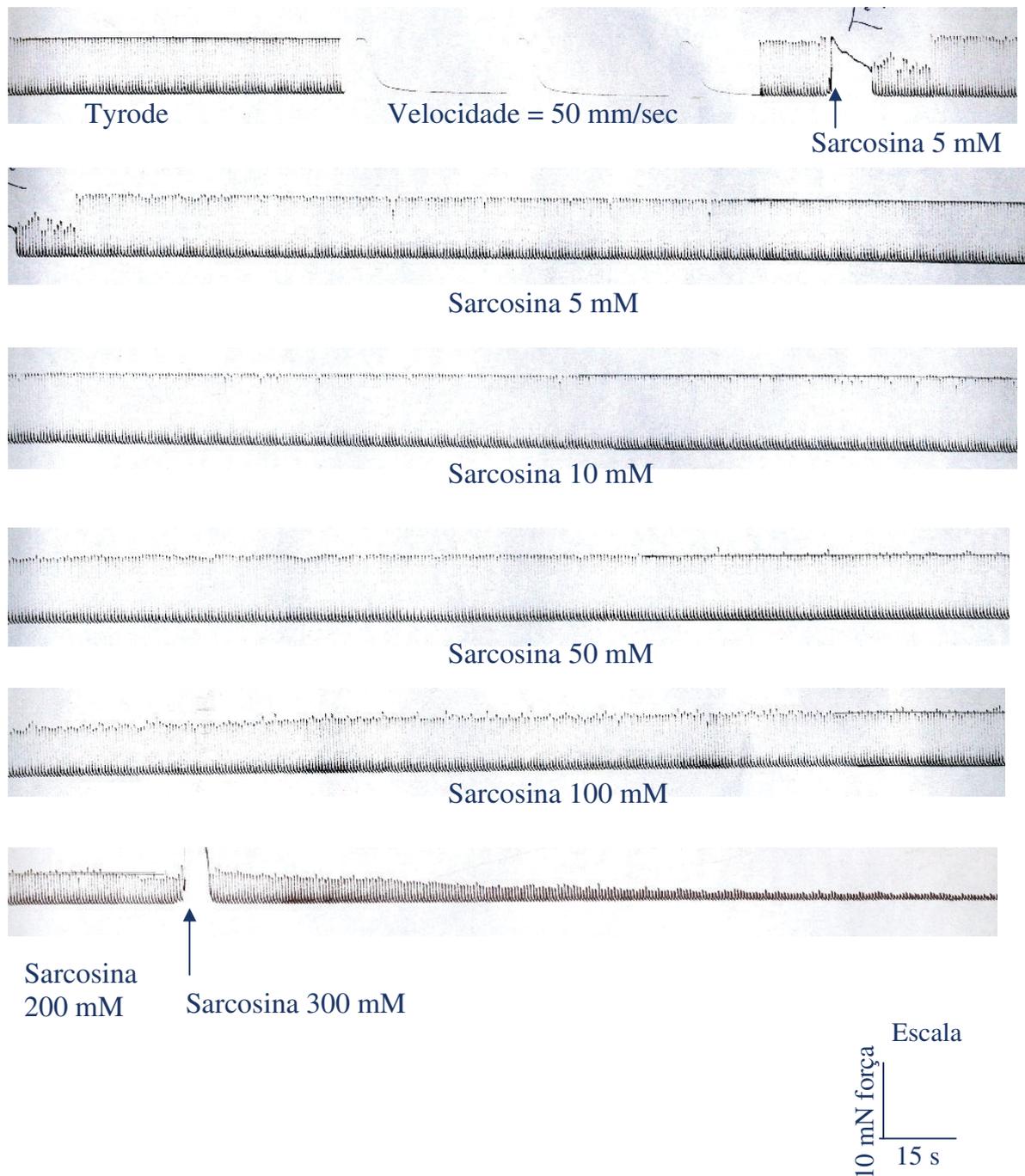


Figura 20 - Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo de uma preparação de músculo diafragma isolado de rato, estimulada indiretamente na ausência e na presença de concentrações crescentes de sarcosina.

EFEITOS DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS NA PRODUÇÃO DE FORÇA DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO ESTIMULADO INDIRETAMENTE

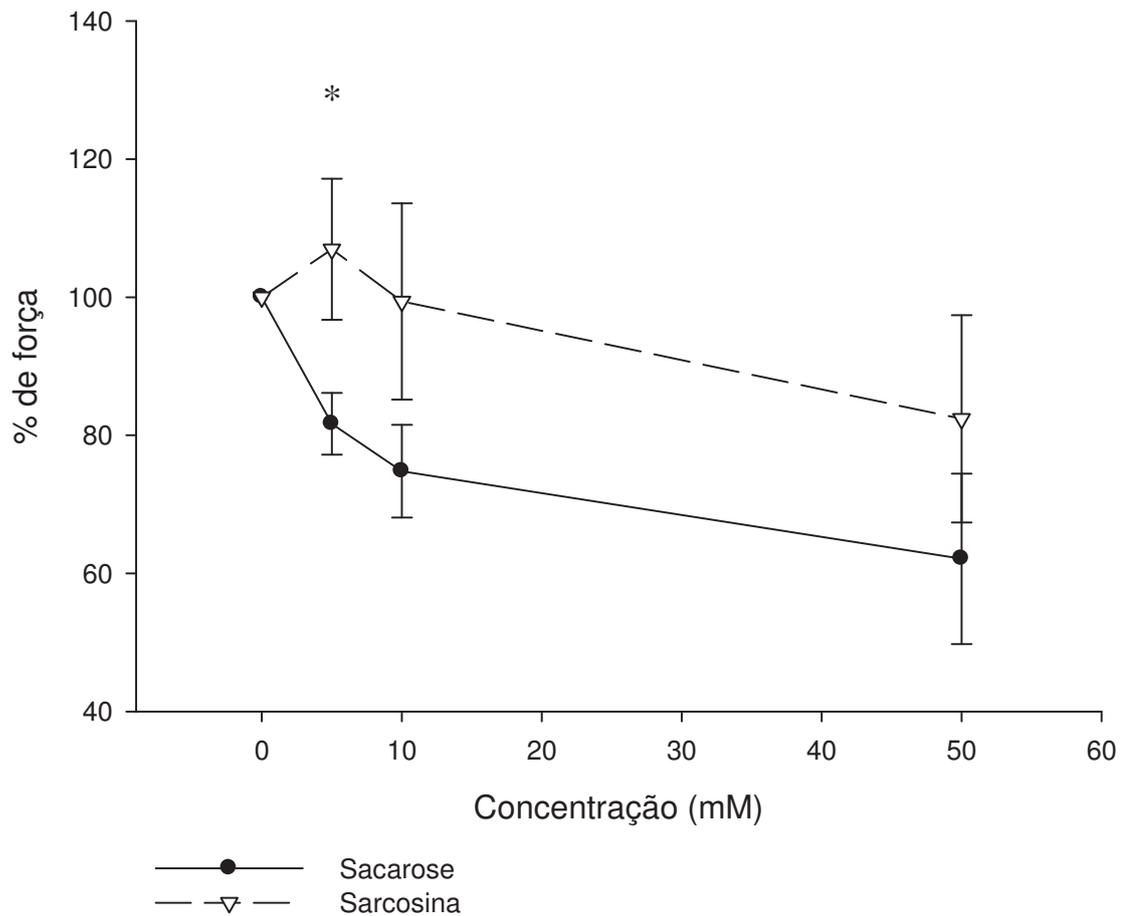


Figura 21 – Representação gráfica dos dados de produção de força (abalo), induzida por estímulo elétrico indireto em músculo diafragma de rato incubado em soluções hipertônicas, ajustadas com sacarose ou sarcosina (5, 10 e 50 mM). Os dados são expressos em porcentagem de força em relação à contração controle, obtida em solução nutritora Tyrode (n = 6)

EFEITOS DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS NA PRODUÇÃO DE FORÇA DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO ESTIMULADO INDIRETAMENTE

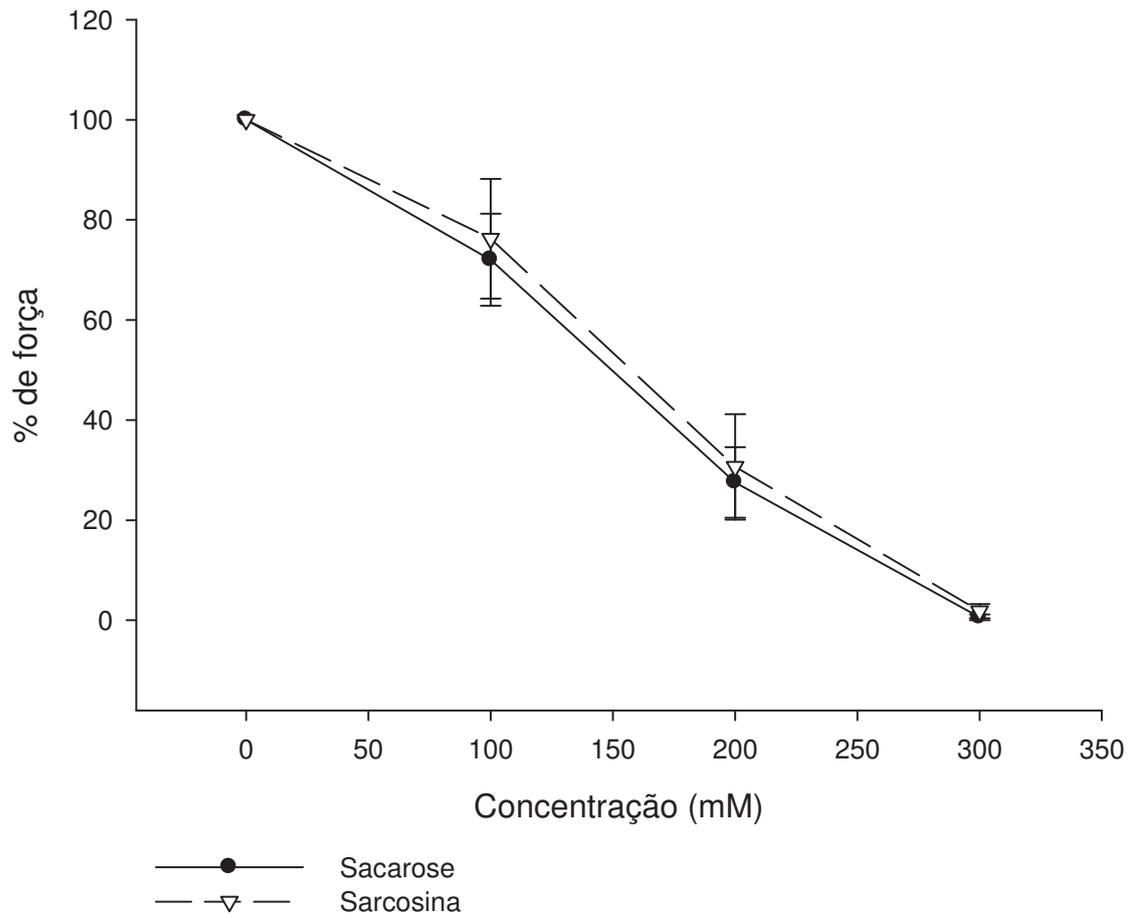


Figura 22 – Representação gráfica dos dados de produção de força induzida por estímulo elétrico indireto, em músculo diafragma de rato incubado em soluções hipertônicas, ajustadas com sacarose ou sarcosina (100, 200 e 300 mM). Os dados estão expressos em porcentagem de força em relação à contração controle (solução nutritora de Tyrode isotônico). (n = 10).

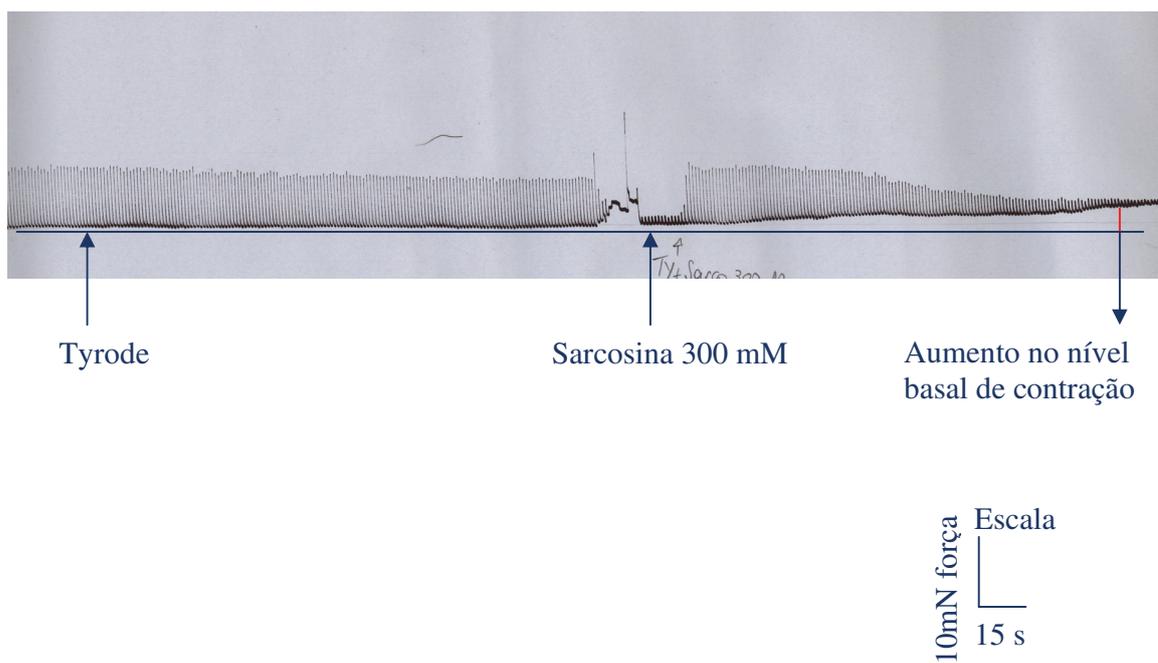
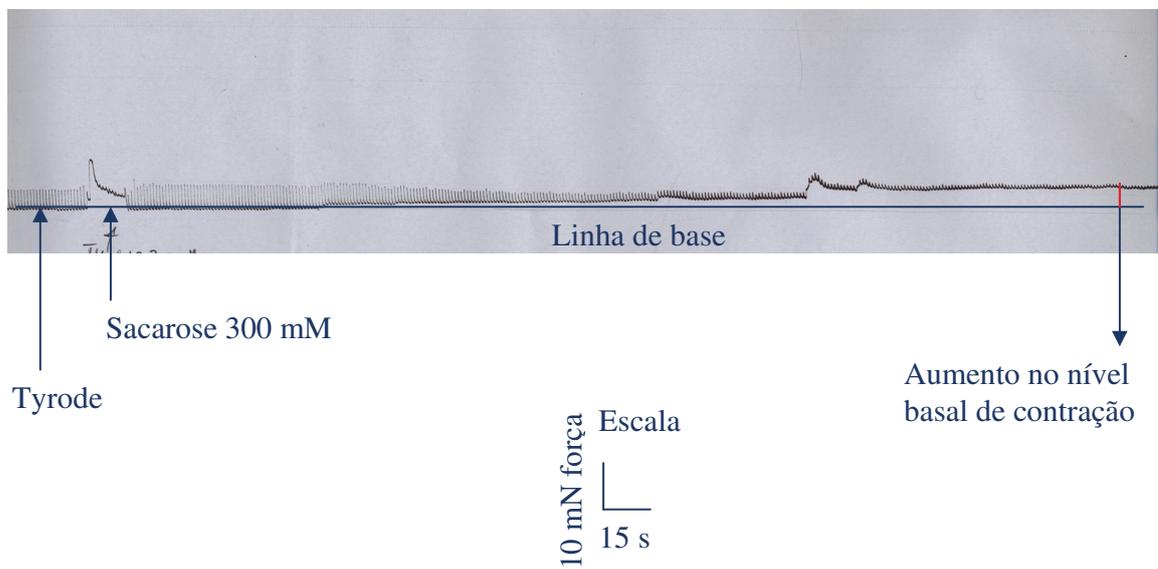


Figura 23 - Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo, de uma preparação de músculo diafragma eletroestimulado indiretamente, na ausência e na presença de sacarose ou sarcosina (300 mM). É possível observar-se que a adição súbita dos omólitos leva a uma diminuição significativa no abalo e ao mesmo tempo um aumento no nível basal de contração.

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SÚBITA A SOLUÇÕES CONTENDO SACROSINA OU SACAROSE (300 mM) NA PRODUÇÃO DE FORÇA DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO ESTIMULADO INDIRETAMENTE

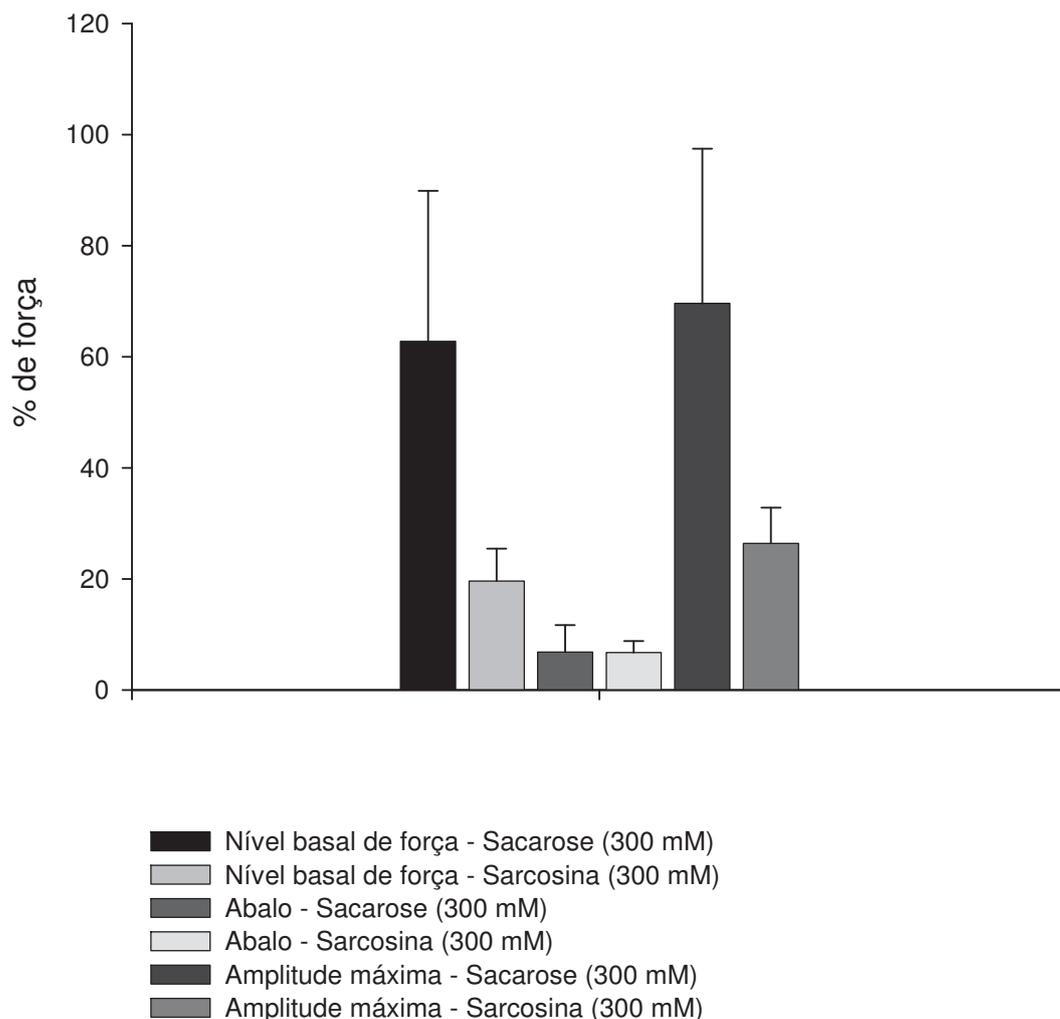


Figura 24 – Representação gráfica do nível basal de força, abalo (“twitch”) e amplitude máxima de contração induzida por estímulo elétrico indireto, em músculo diafragma de rato exposto à soluções hipertônicas, ajustadas com sacarose ou sarcosina (300 mM). Os dados são expressos em porcentagem de força em relação à contração controle, obtida em solução isotônica de Tyrode (n = 5).

5.4 Contração muscular produzida por estimulação elétrica direta

Neste experimento, os feixes musculares de diafragma foram submetidos ao mesmo procedimento do experimento anterior, com exceção de que o estímulo elétrico não foi aplicado no nervo, mas sim diretamente no músculo, mediante eletrodos de platina.

Os eletrodos foram posicionados paralelamente ao feixe, para produzir a despolarização da membrana da célula muscular. As preparações foram curarizadas com d-tubocurarina (10^{-5} g/ml), para bloquear quaisquer efeitos de placa motora. Inicialmente a estimulação elétrica foi realizada em solução de Tyrode isotônico. A seguir, foi testado o efeito do aumento da tonicidade na produção de força, mediante alterações crescentes nas concentrações de sacarose ou sarcosina (5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM), adicionadas à solução controle. Os resultados deste protocolo estão representados na figura 25.

Comparando estes resultados com os obtidos nos experimentos de eletroestimulação indireta, verificou-se que os resultados foram semelhantes. Em baixas concentrações de sarcosina, a força muscular foi parcialmente preservada. O mesmo efeito não foi observado na presença de sacarose. Com 5 mM de sacarose, a contração alcançou $88,96 \pm 3,54$ % da contração controle. Já para 5 mM de sarcosina, a contração foi de $105,09 \pm 6,06$ % da controle. Em solução de Tyrode contendo 10 mM de sarcosina ou sacarose, a produção de força em relação ao controle, foi respectivamente de $105,55 \pm 10,24$ % e $71,89 \pm 7,75$ %. Estes dados exibem uma diferença estatística significativa entre si, havendo diferença na produção de força obtida na presença de cada osmólito. Em soluções contendo 50 mM de sacarose ou sarcosina, os valores de contração muscular em relação ao controle, foram de, respectivamente, $64,07 \pm 8,56$ % e $97,91 \pm 9,60$ %. À medida que a tonicidade da solução que banha o feixe foi aumentada, a força de contração diminuiu. A produção de força de preparações expostas a 200 mM de sacarose ou sarcosina, foi, em relação ao controle, respectivamente de $11,31 \pm 3,50$ % e $14,41 \pm 2,42$ %.

Com o objetivo de se verificar a existência de possíveis diferenças na produção de força de preparações submetidas a aumentos crescentes na tonicidade, daquelas submetidas a um aumento abrupto, foram realizados experimentos nos quais a osmolaridade foi aumentada de 300 para 600 mOsmol/kg de H₂O, mediante adição de sacarose ou sarcosina à solução de Tyrode isotônico. Nestes experimentos foram avaliados os seguintes parâmetros da contração muscular: nível de contração basal

(relaxamento máximo), abalo e amplitude máxima de contração. Um registro original deste experimento encontra-se na figura 26. Nesta figura, pode ser observado também o grau de recuperação da contração muscular após o feixe ter sido incubado em solução hipertônica obtida com adição de sarcosina.

A Figura 27 demonstra que sarcosina ou sacarose foram capazes de aumentar respectivamente o nível de contração basal em $30,95 \pm 14,00$ % e $52,14 \pm 21,23$ % do abalo obtido em solução isotônica. A redução do pico de força também foi significativa. A sarcosina demonstrou reduzi-lo em 80 %, enquanto a sacarose o reduziu em aproximadamente 85 %. A amplitude máxima de contração, obtida de preparações expostas a sarcosina ou sacarose, foi respectivamente de $51,05 \pm 15,73$ % e $67,32 \pm 26,24$ %. De forma semelhante aos resultados obtidos com estimulação indireta, não se observou diferença estatística nestes três parâmetros, entre os valores obtidos com sacarose ou sarcosina.

5.5 Experimentos com TMAO

Conforme trabalhos prévios deste laboratório já citados anteriormente, o TMAO tem demonstrado potencializar a contratura cafeínica e a contração obtida por estimulação elétrica. Para investigar se o TMAO apresenta efeitos distintos da sarcosina na produção de força, foi executada uma série de experimentos utilizando-se este osmólito. Foi realizada a eletroestimulação direta e indireta de preparações de frênico-diafragma na presença de concentrações crescentes (5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM) de TMAO ou sacarose. Nos experimentos de eletroestimulação direta, as preparações foram previamente curarizadas com d-tubocurarina (10^{-5} g/ml).

A figura 28 é um registro original típico de um experimento de eletroestimulação indireta. Nestes experimentos, as soluções tornadas hipertônicas com o uso do TMAO (5, 10 e 50 mM), promoveram um nítido aumento na contração basal. Este efeito não foi observado quando a sacarose foi empregada para elevar a tonicidade da solução de Tyrode.

A figura 30 é a representação gráfica dos dados de força do abalo na presença de TMAO ou sacarose, obtidos por estímulo elétrico indireto. Para ambos os solutos, à medida que a tonicidade da solução de Tyrode foi aumentada, a produção de força diminuiu. Entretanto os achados mais interessantes se encontram nas figuras 29 e 31. A figura 29 representa os dados referentes ao nível basal de contração, enquanto a figura

31 representa a amplitude máxima de contração, obtidas com TMAO ou sacarose. Ambas figuras representam os dados obtidos com a estimulação do nervo frênico. É possível observar na figura 29 um pronunciado aumento na linha de base quando comparado ao abalo. O aumento no nível basal de contração alcançado com TMAO chegou a aproximadamente 100 % da magnitude do abalo controle. Já a sacarose não ocasionou o mesmo efeito. E como conseqüência do aumento do nível basal de contração, a amplitude máxima de contração alcançada com TMAO também foi aumentada. Os valores de força versus a concentração empregada estão representados na figura 31. Verifica-se que a sacarose não produziu os mesmos efeitos obtidos com TMAO.

A figura 32 representa os dados obtidos via estimulação direta do músculo diafragma. Neste protocolo não se observaram diferenças significativas na produção de força do músculo incubado com TMAO ou sacarose. À medida que a concentração da solução que banha as células aumentou, a força diminuiu, demonstrando apenas o puro efeito osmótico atuando sobre as células. Também não se constataram levantamentos no nível de contração de basal. Estes dados sugerem uma possível ação do TMAO no mecanismo de transmissão neuromuscular, uma vez que foram observadas diferenças significativas entre o resultado obtido com adição deste osmólito, se comparado com a adição de sarcosina ou de sacarose.

5.6 Fibra permeabilizada com saponina

Nos experimentos com células musculares esqueléticas permeabilizadas com o uso de saponina, avaliamos os mecanismos envolvidos na captação e liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, bem como o efeito do osmólito sobre o sistema contrátil.

A figura 33 é um registro original de um experimento típico realizado com esta técnica. Inicialmente, quando a fibra estava imersa na solução R, registrou-se uma linha basal de relaxamento. Ao ser imersa em solução pCa 4.0, que contém alta concentração de cálcio, a fibra contraiu, para novamente relaxar quando retornou à solução R. A seguir, foi obtida a contratatura com cafeína (30 mM), produzindo a máxima contratatura cafeínica, e em seguida a contratatura cafeínica submáxima (3 mM), que serviu de controle. Nos registros inferiores estão exibidas as contrações cafeínicas (3mM), obtidas na presença dos osmólitos (sacarose ou sarcosina) nas concentrações de 50 e 100 mM.

EFEITOS DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS NA PRODUÇÃO DE FORÇA DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO ESTIMULADO DIRETAMENTE

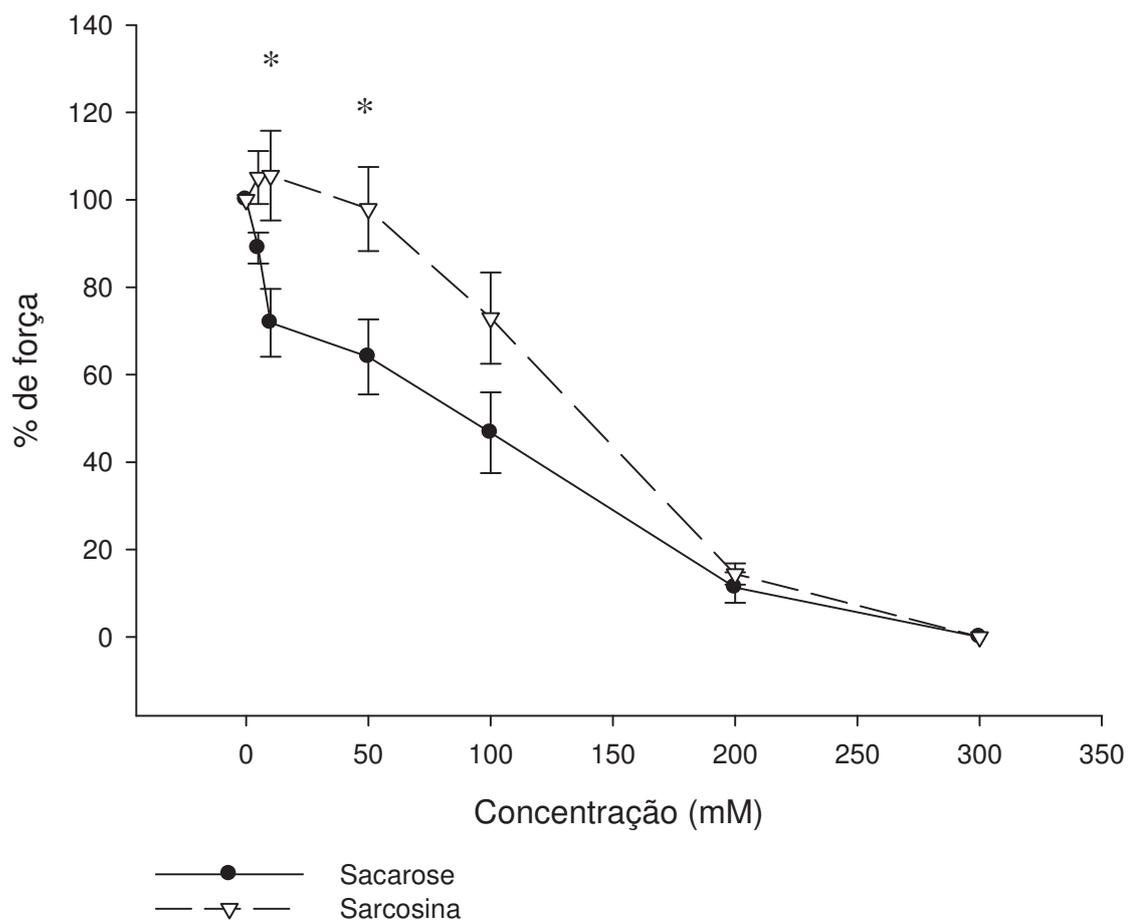
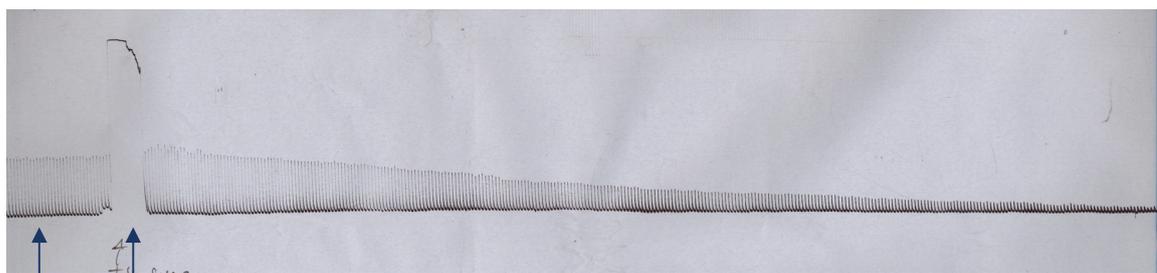
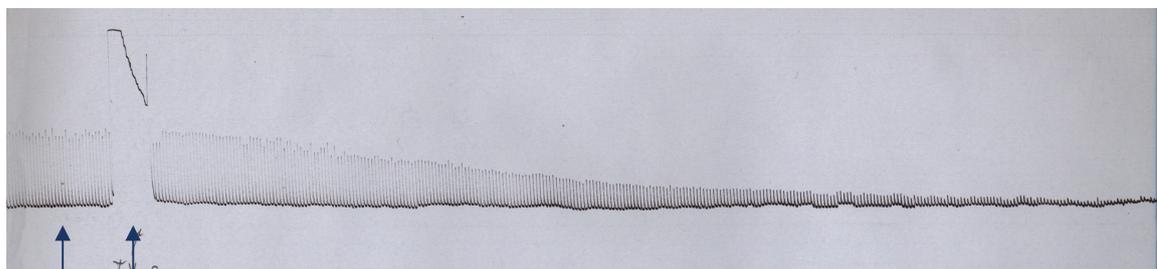


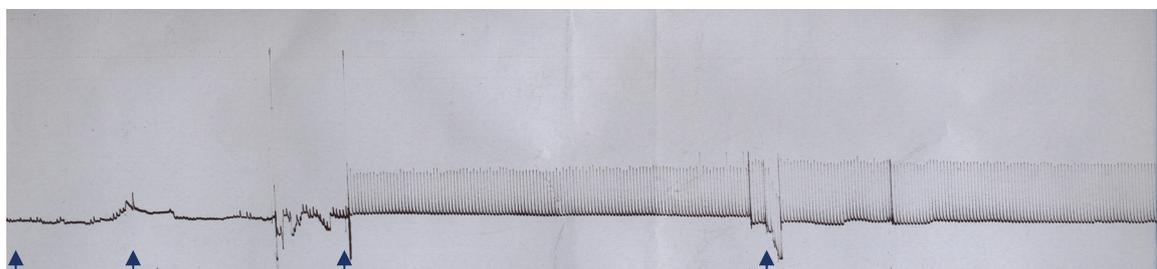
Figura 25 – Representação gráfica da produção de força induzida por estímulo elétrico direto, em músculo diafragma de rato curarizado, incubado em soluções hipertônicas, ajustadas com sacarose ou sarcosina (5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM). Os dados são expressos em porcentagem de força em relação à contração controle, obtida em solução de Tyrode isotônica (n = 6).



Tyrode Sacarose 300 mM



Tyrode Sarcosina 300 mM



Sarcosina 300 mM Tyrode

4 minutos no Tyrode

8 minutos no Tyrode

Escala
10mN força
15 s

Figura 26 - Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo, de uma preparação de músculo diafragma curarizado e eletroestimulado diretamente, na ausência e na presença de sacarose ou sarcosina (300 mM). É possível observar-se que a adição súbita de 300 mM de ambos os omólitos levou a uma diminuição reversível na produção de força.

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SÚBITA A SOLUÇÕES CONTENDO SARCOSINA OU SACAROSE (300 mM) NA PRODUÇÃO DE FORÇA DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO ESTIMULADO DIRETAMENTE

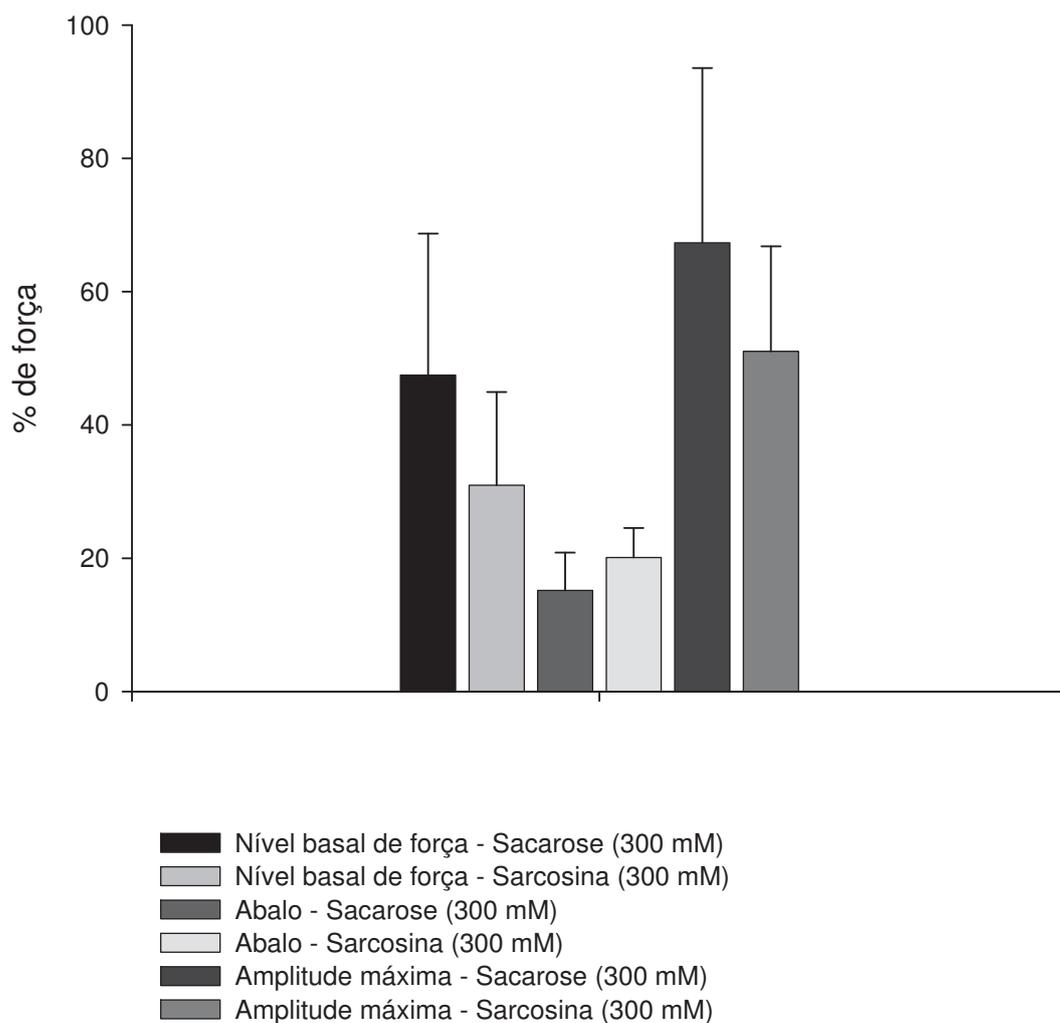


Figura 27 – Representação gráfica do nível basal de força, abalo e amplitude máxima de contração induzida por estímulo elétrico direto, em músculo diafragma de rato exposto a soluções hipertônicas, ajustadas com sacarose ou sarcosina (300 mM). Os dados são expressos em porcentagem de força (abalo) em relação à contração controle, obtida em solução isotônica de Tyrode (n = 5).

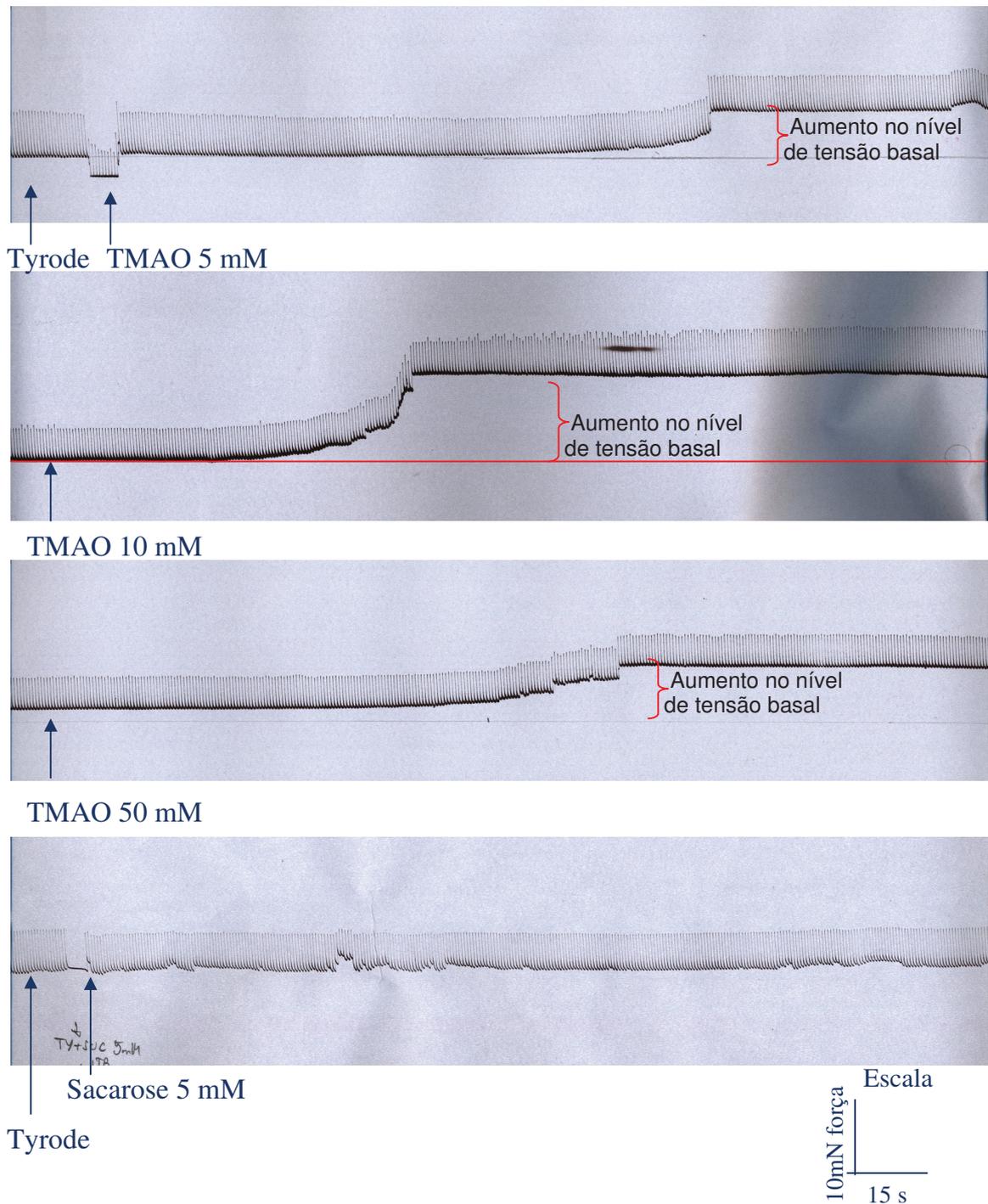


Figura 28 - Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo de preparações estimuladas indiretamente na ausência e na presença de concentrações crescentes de TMAO (5, 10 ou 50 mM) ou de sacarose (5 mM). É possível observar o aumento no nível basal de contração, obtido nas células incubadas com TMAO, mas não com sacarose.

NÍVEL BASAL DE CONTRAÇÃO DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO ESTIMULADO
INDIRETAMENTE NA PRESENÇA DE SACAROSE OU TMAO

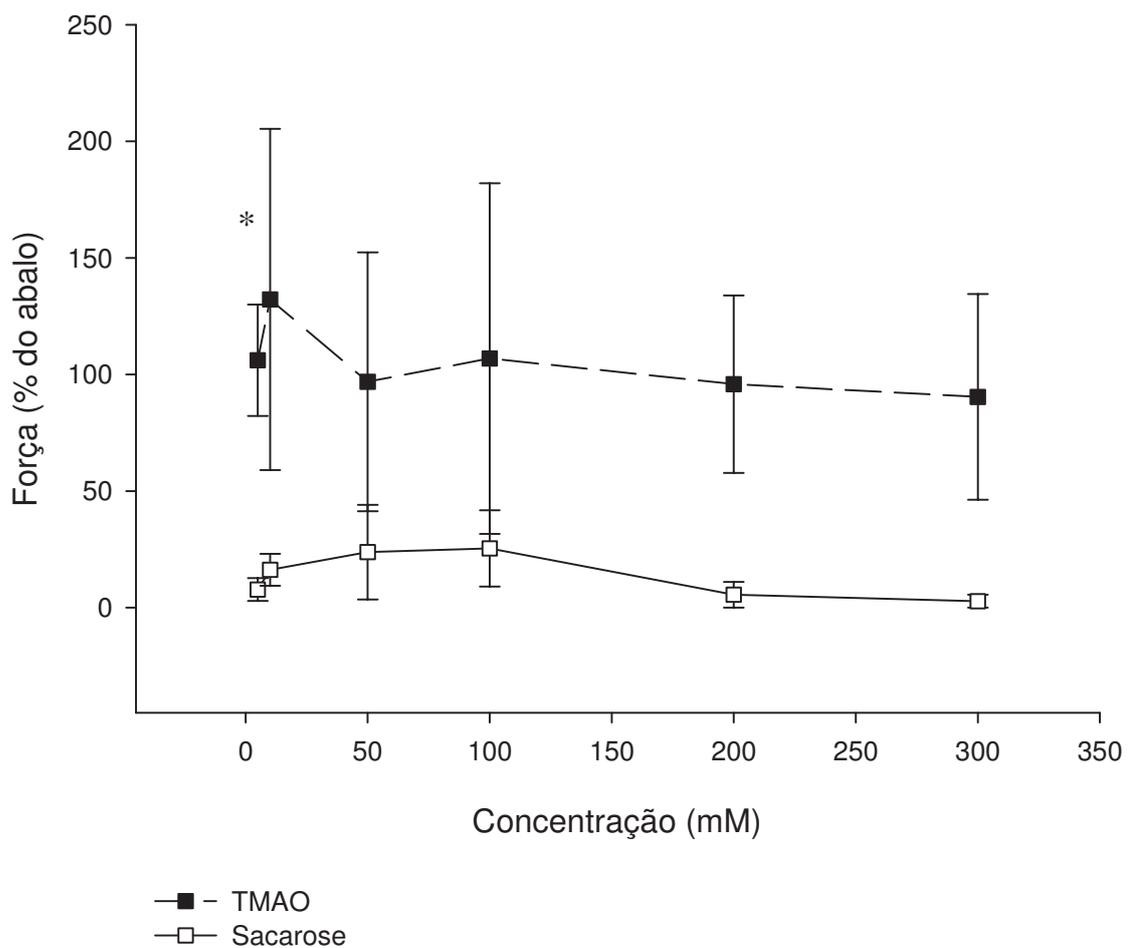


Figura 29 – Representação gráfica do nível basal de contração induzido por estímulo elétrico indireto, em músculo diafragma de rato incubado em soluções hipertônicas, ajustadas com sacarose ou TMAO (5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM). Os dados são expressos em porcentagem de força (abalo), em relação à contração controle, obtida em solução nutritiva Tyrode (n = 5).

PRODUÇÃO DE FORÇA (ABALO) DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO ESTIMULADO INDIRETAMENTE NA PRESENÇA DE SACAROSE OU TMAO

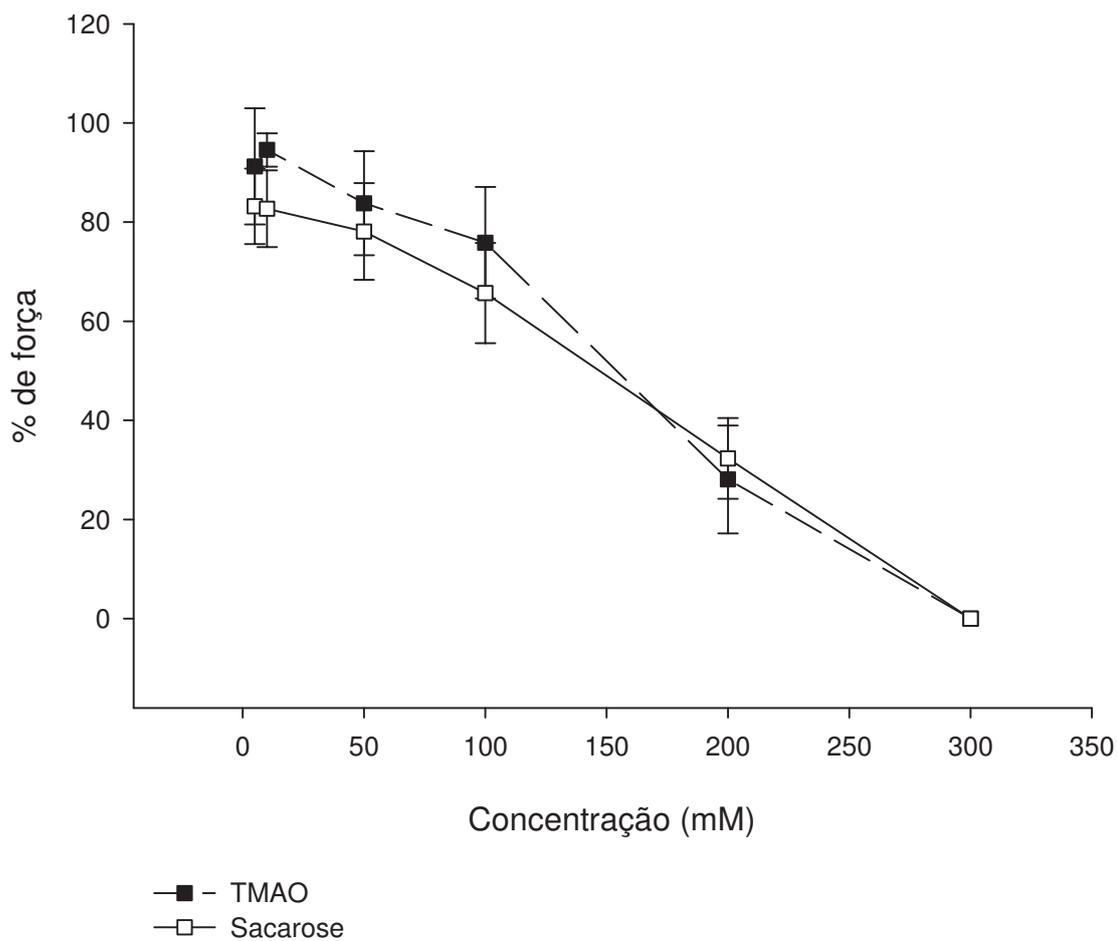


Figura 30 – Representação gráfica da produção de força (abalo) induzida por estímulo elétrico indireto, em músculo diafragma de rato incubado em soluções hipertônicas, ajustadas com sacarose ou TMAO (5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM). Os dados são expressos em porcentagem de força em relação à contração controle (abalo), obtida em solução nutritiva Tyrode (n = 5).

AMPLITUDE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO
ESTIMULADO INDIRETAMENTE NA PRESENÇA DE SACAROSE OU TMAO

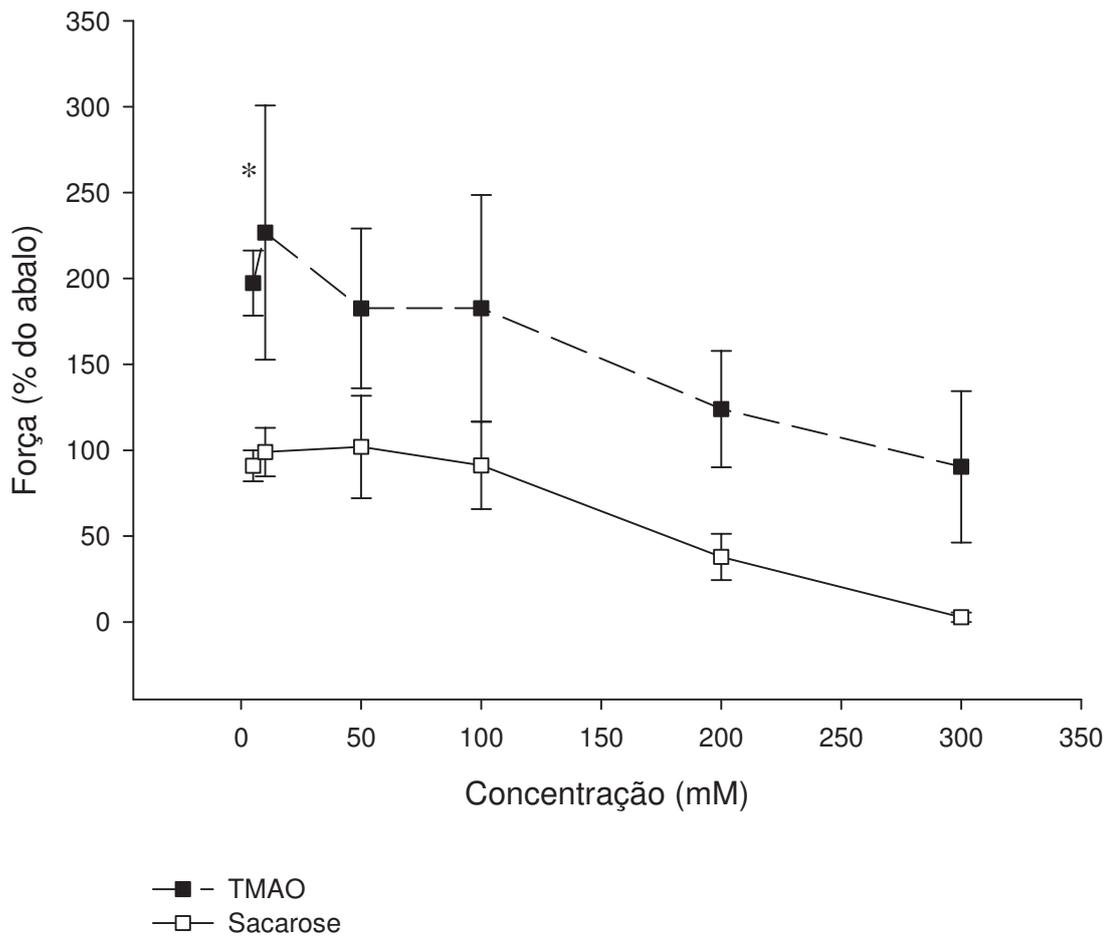


Figura 31 – Representação gráfica da amplitude máxima de contração (somatório do abalo + nível basal de força) induzida por estímulo elétrico indireto, em músculo diafragma de rato incubado em soluções hipertônicas, ajustadas com sacarose ou TMAO (5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM). Os dados são expressos em porcentagem de força em relação ao abalo obtido em solução nutritiva Tyrode (n = 5).

PRODUÇÃO DE FORÇA (ABALO) DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO ESTIMULADO DIRETAMENTE NA PRESENÇA DE SACAROSE OU TMAO

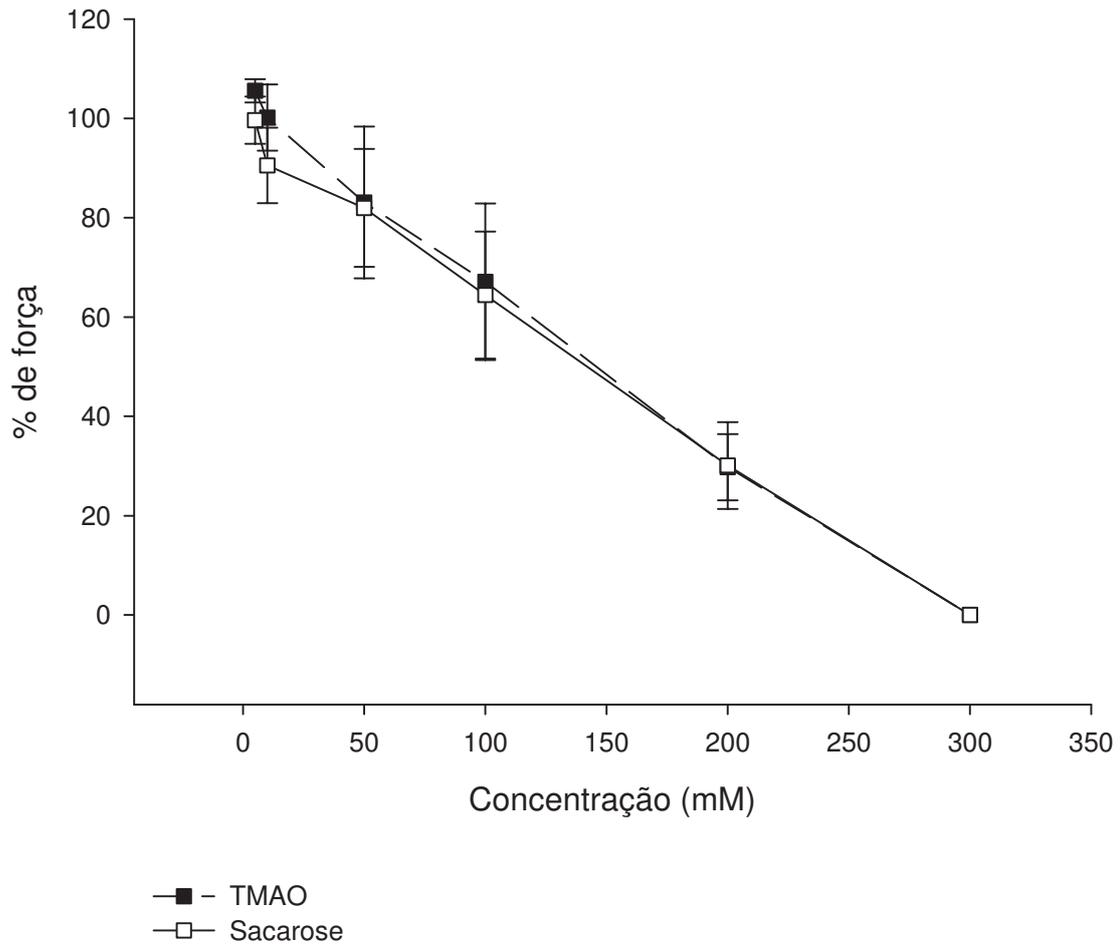


Figura 32 – Representação gráfica da produção de força (abalo) induzida por estímulo elétrico direto, em músculo diafragma de rato incubado em soluções hipertônicas, ajustadas com sacarose ou TMAO (5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM). Os dados são expressos em porcentagem de força em relação à contração controle (abalo), obtida em solução isotônica Tyrode (n = 4).

Na figura 34 estão computados os valores de contração muscular de experimentos com fibra permeabilizada com saponina. Em preparações expostas a 3 mM de cafeína, a produção de força atingiu cerca de 30 % da resposta contrátil obtida com 30 mM de cafeína, o que corrobora os dados de LUNKMOSS (2002). A exposição das preparações a soluções contendo 50 ou 100 mM de sarcosina ou sacarose, em combinação com cafeína (3 mM) não promoveram incremento da força de contração. Por outro lado, neste experimento também não se observou diminuição na produção de força frente à exposição a estes solutos. Na concentração de 50 mM de sacarose ou sarcosina, a força produzida em relação ao controle foi, respectivamente de, $123,68 \pm 16,84$ % e $106,41 \pm 22,34$ %. Na presença de sacarose ou sarcosina (100 mM), a produção de força foi respectivamente de, $115,76 \pm 11,27$ % e $108,44 \pm 8,08$ %. Nestes experimentos não se observou diferença estatística entre os valores de força entre sacarose e sarcosina, ou entre o controle e as soluções hipertônicas. Estes dados sugerem que as soluções hipertônicas parecem não influenciar a liberação de cálcio do retículo, uma vez que não foram capazes nem de aumentar, nem de diminuir a produção de força induzida pela cafeína. As soluções hipertônicas obtidas tanto com sacarose quanto com sarcosina também não promoveram liberação de cálcio do RS. Isto porquê não se verificou contração muscular quando as preparações foram expostas a soluções contendo baixa concentração de Ca^{2+} na presença de sacarose ou sarcosina.

5.7 Massa Celular

Como não foi encontrado na literatura o coeficiente de reflexão da membrana plasmática de células musculares para a sarcosina, investigamos a variação de massa de células musculares de diafragma de rato incubadas com este osmólito. Para comparação, foi utilizado como controle a variação de massa em células de diafragma de rato incubadas com sacarose. A sacarose demonstra não permear a membrana, tendo um coeficiente de reflexão (σ) = 1.

Analisando-se os valores de massa celular ao longo do tempo (figura 35), em preparações submetidas a soluções contendo sarcosina ou sacarose (50 mM), constatamos que os valores de massa dos músculos incubados com estes compostos não diferiram significativamente. Observamos ainda que para estes músculos, expostos previamente nos dois compostos, houve uma recuperação na massa celular, quando retornaram à solução isotônica. Isto sugere que a membrana do músculo diafragma de rato apresenta valores de coeficiente de reflexão muito semelhantes para os dois solutos.

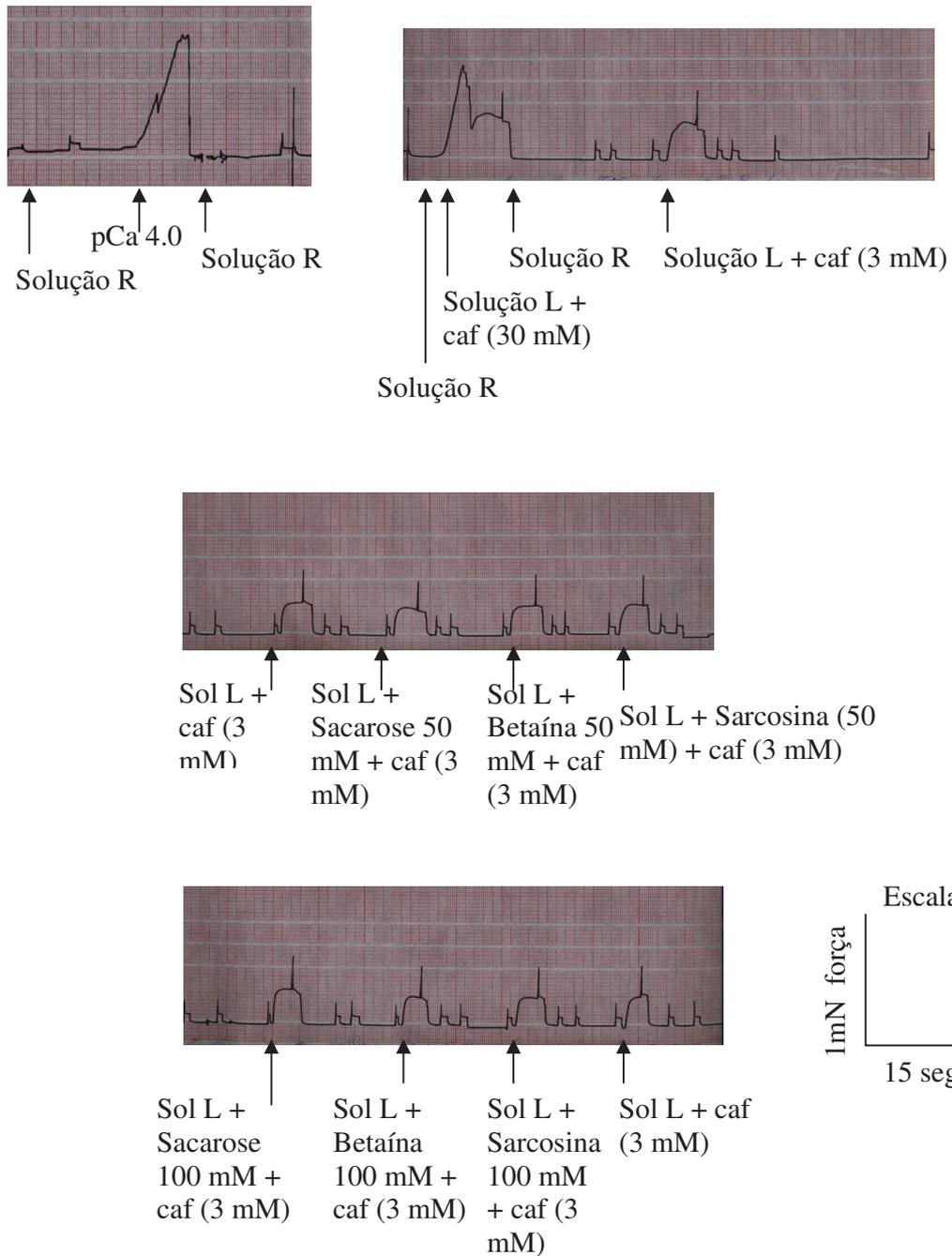


Figura 33 - Registro original de um experimento típico, demonstrando a produção de força no tempo, de uma preparação de fibra muscular de ílio-psoas permeabilizada com saponina, na ausência e na presença de sacarose ou sarcosina (50 e 100 mM).

EFEITOS DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS SOBRE A PRODUÇÃO DE FORÇA DE MÚSCULO ÍLIO-PSOAS DE RATO PERMEABILIZADO COM SAPONINA

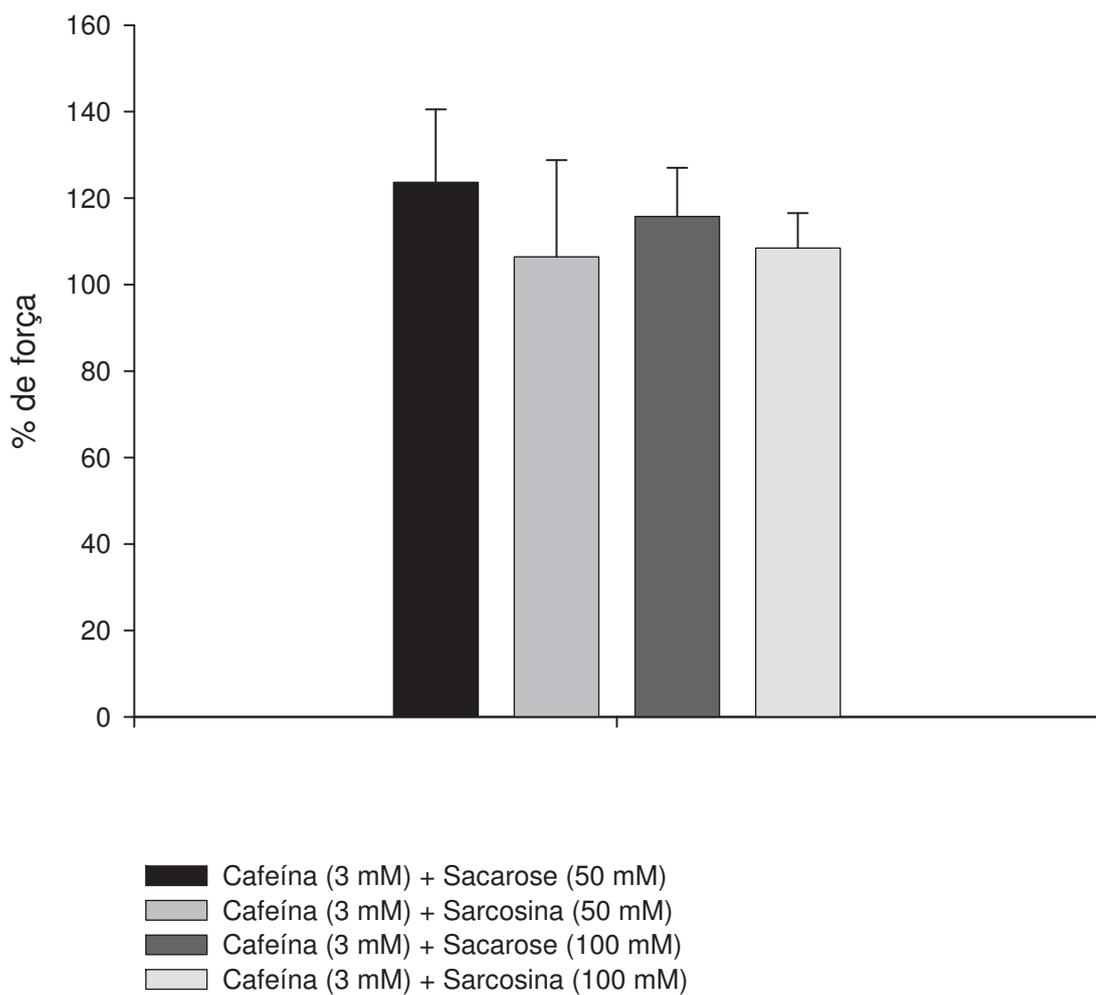


Figura 34 – Representação gráfica da produção de força de músculo ílio-psoas de rato permeabilizado com saponina (60 µg/ml), induzida por cafeína (3 mM), na presença de sacarose ou sarcosina (50 e 100 mM). Os dados são expressos em porcentagem em relação à contratura cafeínica controle (3 mM) (n = 6).

EFEITOS DA SARCOSINA OU SACAROSE NA VARIAÇÃO DA MASSA CELULAR DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO

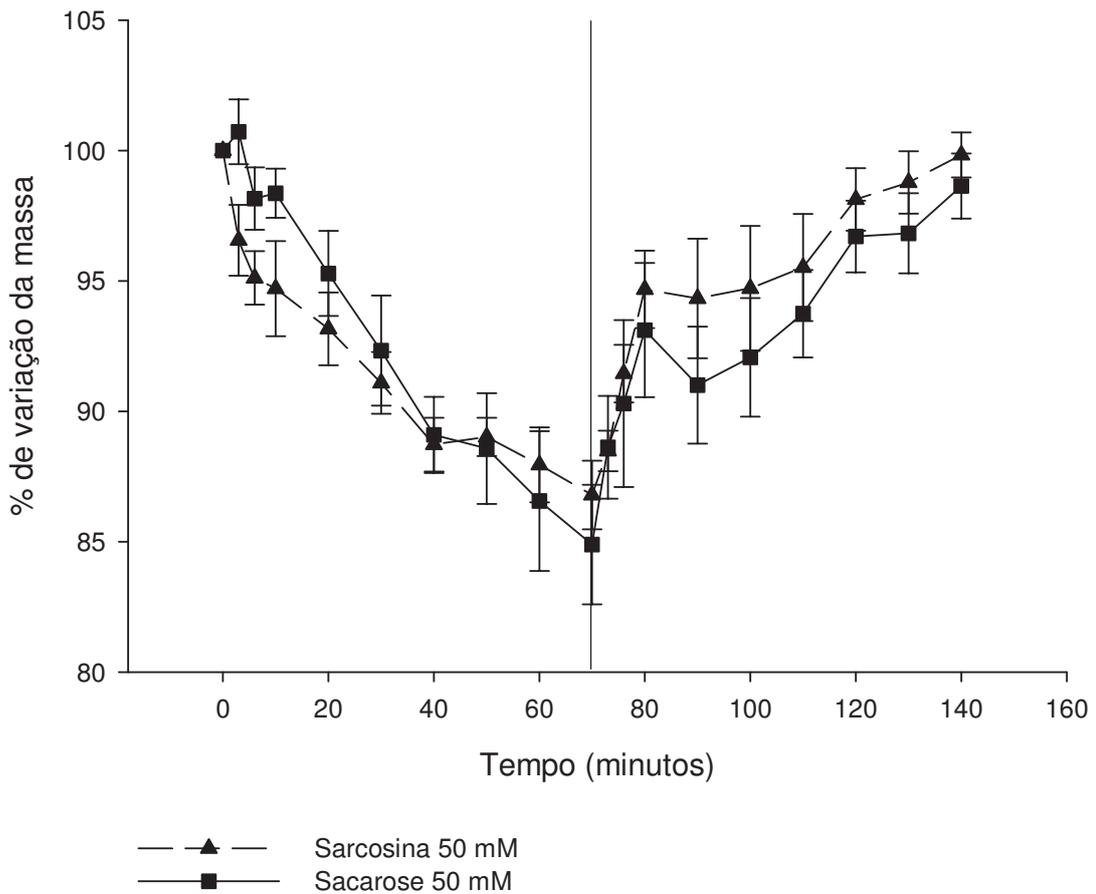


Figura 35 – Curso temporal das variações de massa do músculo diafragma de rato quando incubados em solução contendo 50 mM de sacarose ou sarcosina. Os músculos permaneceram em solução contendo estes osmólitos durante os primeiros 70 minutos, e após este tempo eles retornaram ao Tyrode Normal conforme indicado pela linha vertical. Os símbolos correspondem aos valores de massa muscular, expressos em valores percentuais daqueles obtidos no tempo zero (Tyrode isotônico normal) e mensurados nos tempos correspondentes (n = 6).

6. DISCUSSÃO

O fisiologista Walter Bradford Cannon, em 1932, criou o termo “homeostasia”, para designar a capacidade de um organismo em regular seu meio interno. Toda criatura viva busca constantemente, portanto, manter o seu estado de equilíbrio interno. Dentre alguns dos principais parâmetros sob controle homeostático está a regulação da osmolaridade do líquido extracelular. Assim, situações capazes de perturbar esse estado, que pode estar associado a variações de tonicidade do meio, podem causar prejuízos a diversas funções do organismo. A variação na tonicidade pode ser decorrente de alterações na osmolaridade dos compartimentos intra e/ou extracelular, podendo levar a um fluxo resultante de água, o principal solvente encontrado na natureza, entre estes dois ambientes. A água é universalmente considerada como a mais importante molécula da vida, e a capacidade de um organismo em manejar situações de alterações em seu conteúdo hídrico é essencial para sua sobrevivência. Perdas do conteúdo hídrico são uma ameaça para diversos seres, podendo ocorrer por evaporação para o ar, durante a excreção ou por osmose em ambientes circundantes muito concentrados. Esta última situação pode ocorrer em ambientes salinos, por congelamento extracelular ou por doenças que causam um desequilíbrio osmótico, como o diabetes, associado à elevada concentração de glicose no sangue (hiperglicemia) (YANCEY, 2005).

Diversos organismos submetidos a variações estressantes do meio em que se encontram são capazes de contornar as situações que tendem a perturbar sua homeostasia. Tanto o líquido extracelular quanto o intracelular estão em constante regulação da osmolaridade, volume e composição química. Este estado de constância do meio interno é fundamental para o funcionamento adequado, seja a nível celular ou molecular, seja a nível orgânico.

As células musculares são uma categoria de células sujeitas a sofrerem alterações em seu funcionamento, frente a mudanças na tonicidade de seu líquido extracelular. Uma das funções particularmente prejudicadas em células musculares estriadas esqueléticas é a capacidade de geração de força (CAPUTO, 1968; GORDON & GODT, 1970; GODT *et al.*, 1993). Tem sido demonstrado na literatura, que o incremento na tonicidade, obtido com compostos impermeáveis ao sarcolema, é capaz de reduzir a produção de força (GORDON & GODT, 1970; SUAREZ-KURTZ & SORENSON, 1977b; VAUGHAN *et al.*, 1983). Entretanto, de forma paradoxal, outros autores demonstraram, em condições experimentais semelhantes, um aumento na produção de força (CAPUTO, 1968).

Neste estudo objetivou-se avaliar os efeitos do aumento de tonicidade obtido com sarcosina, TMAO ou sacarose no processo de AEC e na transmissão neuromuscular de músculo esquelético de ratos. A sarcosina é um osmólito sintetizado por diversos organismos capaz de proteger estruturas celulares. Estudos demonstram que esta metilamina pode contrabalançar os efeitos deletérios da uréia na atividade biológica de diversas proteínas e enzimas (BAGNASCO, 2000; IBARRA-MOLERO, *et al.*, 2000; WHITERS & GUPPY, 1996). Portanto a questão central que moveu esta pesquisa foi: seria a sarcosina um osmólito compatível com as funções celulares de mamífero, manifestando efeitos protetores sobre o mecanismo de AEC e de transmissão neuromuscular?

Estudos deste laboratório de Fisiologia da Contração Muscular demonstram que outras metilaminas, como óxido de trimetilamina (TMAO) e betaína são capazes de potencializar a força de contração induzida por alta concentração de potássio ou a contratura induzida por cafeína. Segundo LUNKMOSS (2002), o TMAO (100 mM) é capaz de produzir uma força de contração de músculo sartório de rã duas vezes maior que aquela obtida em solução isotônica. E os resultados obtidos na presente pesquisa estão de acordo com aqueles. Em preparações utilizando músculo diafragma de rato, 50 mM de sacarose produziram quase o dobro da contratura potássica, enquanto que 50 mM de sarcosina potencializaram duas vezes e meia a força de contração obtida em solução isotônica. Estes valores já nos levam a crer que a sarcosina é um osmólito compatível com a espécie estudada, uma vez que foi capaz não somente de manter, mas como potencializar a contração potássica. Neste experimento, as células incubadas em solução hipertônica ajustada com sarcosina produziram uma força de contração significativamente maior que em solução ajustada com sacarose. E nas soluções de relaxamento, onde os solutos (50 mM) foram adicionados ao Tyrode Normal, foi observada ainda a produção de uma contratura “per se” significativamente maior quando na presença de solução contendo sarcosina, quando comparada à sacarose. Isso demonstra que para esta conduta experimental, não existe apenas um efeito da tonicidade, uma vez que o aumento da tonicidade obtido com sarcosina exibiu resultados diferentes daquele obtido com sacarose.

Como já observado, osmólitos são tipicamente chamados solutos compatíveis, baseado na hipótese de que estes solutos (com algumas exceções) não interagem com macromoléculas por caminhos prejudiciais, podendo ser produzidos ou destruídos com pequeno impacto sobre as funções celulares (YANCEY *et al.*, 1982). Isso contrasta com

alguns íons inorgânicos, que em altas concentrações costumam desestabilizar proteínas e ácidos nucleicos (KÜLTZ & CHAKRAVARTY, 2001).

Os osmólitos, e aí se inclui a sarcosina, são capazes de proteger as proteínas e agregados macromoleculares tanto de efeitos destrutivos de certos ambientes externos (como aumento de pressão hidrostática, aumento de força iônica), quanto de condições agressivas do meio interno (YANCEY, *et al.*, 1979). Seria possível, portanto, que a sarcosina esteja estabilizando estrutura e funcionalmente proteínas envolvidas no mecanismo de AEC, frente a esta situação de aumento de tonicidade. Isto também pôde ser observado ao expormos as células musculares em soluções hipertônicas ajustadas com sarcosina e induzirmos a liberação de cálcio do retículo, com o uso da cafeína. As células, mesmo estando em soluções hipertônicas (50 mM), foram capazes de manter a sua força de contração, e ainda potencializar a contratatura cafeínica. Mas diferentemente do que ocorreu no experimento obtido com contração potássica, não houve aqui diferença significativa entre os efeitos do aumento da tonicidade do meio obtidos com sarcosina ou sacarose. E também diferentemente dos dados já obtidos neste laboratório, a potencialização da contratatura cafeínica observada na presença de sarcosina não foi da mesma magnitude daquela observada na presença do TMAO. Enquanto o TMAO pode aumentar em até vinte vezes a contratatura cafeínica, a sarcosina chega apenas a duplicá-la.

Segundo TIMASHEFF (2002), os osmólitos ajudam a manter a conformação nativa por serem excluídos preferencialmente das vizinhanças das proteínas. Essa exclusão desempenhada pelos osmólitos levaria a um aumento na concentração de água nas regiões circunvizinhas à proteína. O resultante aumento na tensão da superfície iria então favorecer uma diminuição na área de superfície da proteína, promovendo o estado de enovelamento, isto é, o estado de conformação nativa, com mais baixo gasto energético. Estudos subseqüentes desenvolvidos por BOLEN & BASKAKOV (2001), concluíram que na presença de osmólitos, interações entre estes e o eixo central do peptídeo (não as cadeias laterais ou grupo "R") iriam realçar o próprio enovelamento da proteína. Com base nessas observações, os osmólitos protetores têm sido coletivamente referidos como "chaperonas químicas", por refletir seu amplo espectro de ações em promover o correto enovelamento de proteínas, que devido a mutações, às vezes falham em se manter em seu estado nativo (HOWARD *et al.*, 2003).

A potencialização da força de contração observada nos experimentos de contratatura potássica e cafeínica não foi observada nos experimentos envolvendo estímulo

elétrico. Nesta série de testes, tanto se utilizando estimulação elétrica direta, via despolarização do sarcolema, quanto indireta, via despolarização do nervo e subsequente transmissão neuromuscular, não houve aumento significativo na produção de força. Quando se utiliza uma concentração de até 100 mM de sarcosina no banho, grande parte da força foi mantida. Com adição de sacarose os resultados foram semelhantes, embora a sarcosina demonstre ser mais efetiva do que a sacarose em manter a produção de força, no estímulo elétrico direto, em concentrações de 10 e 50 mM e no estímulo indireto na concentração de 5 mM,. Porém ao aumentar ainda mais a concentração da solução que está banhando os feixes musculares, a produção de força diminuiu drasticamente, independente se o aumento é obtido com sacarose ou com sarcosina.

A redução na produção de força tem sido atribuída, segundo alguns autores, a alterações no processo de acoplamento excitação-contração (SUAREZ-KURTZ & SORENSON, 1977b; COUTINHO *et al.*, 1982; SATO & FUJINO, 1987; CHAWLA *et al.*, 2001). Disfunções neste processo poderiam explicar a redução de força obtida nesses protocolos onde se despolarizou a membrana do nervo ou do músculo através de estimulação elétrica. Os dados referentes a estes experimentos revelaram uma diminuição significativa da força de contração à medida que a tonicidade do meio extracelular aumenta, especialmente acima de 100 mM. A contração muscular chegou a cessar, abolindo a produção de força com concentrações de 300 mM de sacarose ou sarcosina. Estes resultados sugerem que esta diminuição na produção de força é decorrente do próprio aumento da tonicidade, que resultaria em grande perda do teor hídrico da célula.

Outros autores atribuem essa redução de força de contração muscular a uma diminuição na capacidade de geração de força pelo sistema contrátil em conseqüência do aumento da força iônica intracelular, a qual decorreria da perda de água intracelular quando essas células são expostas a soluções hipertônicas (HOMSHER *et al.*, 1974; GODT *et al.*, 1984; PIAZZESI *et al.*, 1994). Neste caso, à medida que a força iônica intracelular aumenta, a sensibilidade ao cálcio da atividade ATPase da actomiosina é alterada, sendo necessário mais cálcio para produzir um determinado ganho percentual de força (GORDON *et al.*, 1973). Acredita-se que sob condições hipertônicas, há uma mudança no ângulo de encaixe da cabeça da miosina com actina, impedindo, em parte, o ciclo de pontes transversas, diminuindo assim a tensão no músculo (VAUGHAN, *et al.* 1983). Em músculo de crustáceo foi demonstrado que o aumento da força iônica induz redução da capacidade de produção de força do sistema contrátil (GODT *et al.*, 1993). Tal

redução de força de contração pode ser revertida quando adiciona-se à solução osmólitos de ocorrência natural, como TMAO e betaína (GODT *et al.*, 1993).

Acredita-se que na presença de osmólitos protetores ocorrem alterações na solvatação que mudam as estruturas de proteínas. As proteínas mudam em muitas vezes, as suas preferências de solvatação (entre a água e o osmólito), à medida que a concentração do osmólito varia. A contribuição da hidratação para estabilização de proteínas feita por osmólitos protetores é pequena em ambas concentrações de osmólitos, muito baixas e muito altas. Mas em concentrações de osmólitos intermediárias, a hidratação se torna importante (RÖSGEN, *et al.*, 2005). Isso em parte explica os achados da presente pesquisa. Nos experimentos realizados com estimulação elétrica a produção de força foi abolida utilizando-se concentrações muito altas dos solutos. E para confirmar esta hipótese, tentando descartar os efeitos da exposição por tempo prolongado às soluções hipertônicas, foram realizados os experimentos onde se adicionava subitamente 300 mM dos solutos à solução controle. E a hipótese se confirma, uma vez que a produção do abalo diminuiu severamente, tanto aquele obtido em eletroestimulação direta quanto indireta. Já em concentrações intermediárias (até 100 mM), a produção de força foi mantida, podendo até mesmo ser potencializada, o que converge com os resultados obtidos nos experimentos de contratura potássica e cafeínica. Nos experimentos realizados com fibra permeabilizada, onde os solutos podem adentrar no citoplasma, influenciando a liberação de cálcio do retículo, foi constatado que 50 e 100 mM de sacarose ou sarcosina não foram capazes de potencializar esta liberação de cálcio. Por outro lado, também não promoveram efeitos deletérios sobre este mecanismo, uma vez que a produção de força obtida na presença destes osmólitos e mesmo após a exposição a eles, foi a mesma daquela obtida no controle. Nestes experimentos, a sarcosina ou a sacarose não induziram a contração muscular. Estes dados sugerem que tais osmólitos não afetam de forma direta o mecanismo de liberação de Ca^{2+} induzido por Ca^{2+} . Por outro lado, como estes osmólitos potencializaram a contração induzida pela cafeína em músculo intacto, estes dados sugerem também que é necessário a integridade do sistema de transdução do sinal elétrico da membrana citoplasmática à liberação de cálcio do RS. Assim, provavelmente as soluções hipertônicas alteram importantes etapas desse processo, conforme demonstrado por CHAWLA *et al.* (2001). Nesse trabalho, os autores demonstraram que o aumento da tonicidade do líquido extracelular provoca importantes alterações reversíveis do espaço existente entre as membranas do sistema tubular transversal e da cisterna terminal do RS. É provável que tais alterações não

ocorram em células permeabilizadas com o uso de saponina, visto que este glicosídeo abole a característica de permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática.

A concentração de osmólitos empregada neste estudo está próxima daquela encontrada fisiologicamente em diversos organismos (WHITERS *et al.*, 1994). É pertinente ressaltar que a concentração de osmólitos é bastante variável de espécie para espécie e de tecido para tecido. Para alguns animais marinhos, como peixes, a concentração de TMAO no meio intracelular é sempre maior que a de outras metilaminas, especialmente nas células musculares, podendo alcançar valores de até 290 mmol/l. Para outras espécies de peixes marinhos, o principal osmólito é a betaína, com concentrações de 50 a 70 mmol/kg (BEDFORD *et al.*, 1998). Já a concentração de sarcosina em células musculares esqueléticas de peixes elasmobrânquios, varia de 0,5 mmol/l na espécie *Furgaleus ventralis*, 69 mmol/l no *Carcharhinus obscurus* e 11,2 mmol/l no *Aptychotrema vincentiana* (WHITERS *et al.*, 1994). Em mamíferos, os dados sobre a concentração de sarcosina em músculos são mais escassos. Em músculo cardíaco de ratos, a concentração do osmólito taurina pode chegar a aproximadamente 20 mmol/kg de água. Segundo KWON *et al.*, (1996), no músculo da bexiga de ratos a quantidade de osmólitos é de aproximadamente 85,5 ±10,9 mmol/kg, sendo composto por Inositol (73,4 ±10,7 mmol/kg), GPC (11,8 ±5,0 mmol/kg) e betaína (0,3 ±0,1 mmol/kg). O aumento na osmolaridade da urina é associado com aumento de 1,5 vezes nos níveis de osmólitos (especialmente GPC) no tecido muscular da bexiga. Já na medula renal de ratos e coelhos a concentração de metilaminas pode chegar até a 90 mmol/kg de peso tecidual (BALABAN & KNEPPER, 1983).

Acredita-se então que nessas concentrações intermediárias, a sarcosina, assim como outros osmólitos naturais exerçam seu efeito protetor. Os osmólitos exibem um comportamento de aumentar o “valor constante de enovelamento” (*rate constant of folding*) e ao mesmo tempo diminuir o “valor constante de desenovelamento” (*rate constant of unfolding*) de proteínas. Os efeitos dos osmólitos no estado de conformação são explicados através do entendimento dos princípios dos efeitos dos osmólitos na estabilidade protéica. Esses princípios envolvem o efeito osmofóbico, que altera a energia de Gibbs do estado desnaturado devido a exposição do eixo central peptídico, portanto aumentando o nível de “enovelamento” (RUSSO *et al.*, 2003).

O efeito osmofóbico foi descrito inicialmente por BOLEN & BOSKAKOV (2001), e se refere à propriedade dos osmólitos de promoverem interações desfavoráveis entre o

osmólito e o eixo central do peptídeo, gerando uma força termodinâmica solvofóbica, chamada de efeito osmofóbico. Devido a alta exposição do eixo central do peptídeo ao osmólito em estados de desnaturação, o efeito osmofóbico preferencialmente aumenta a energia livre (ΔG) do estado desnaturado, deslocando o equilíbrio a favor do estado nativo. O efeito osmofóbico é uma nova força termodinâmica encontrada na natureza, que complementa as já reconhecidas interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, eletrostática e forças de dispersão que conduzem o enovelamento protéico.

Em um estudo sobre o estado de conformação protéica frente exposição à uréia, RUSSO e colegas (2003) demonstraram que as metilaminas, incluindo sarcosina e TMAO, são capazes de manter em um maior grau o estado de configuração nativa quando comparadas à outras classes de osmólitos, como polióis e aminoácidos e seus derivados, conseguindo minimizar os efeitos de desnaturação causados pela uréia. Isso demonstra grande variabilidade química e funcional dos osmólitos, embora a base de sua capacidade de estabilização protéica seja a mesma: todos aumentam o valor da constante de enovelamento e diminuem o valor da constante de desnovelamento.

Segundo YANCEY e colaboradores (2001; 2002), e BOLEN E BASKAKOV (2001), existem diferenças no grau de estabilização protéica inclusive entre as diferentes metilaminas. Para os autores, tanto betaína quanto sarcosina também agem como estabilizadores, e contrabalanceantes, mas o TMAO é normalmente mais efetivo. BOLEN E BASKAKOV (2001) também constataram que o ranking de eficiência forçando o enovelamento protéico da ribonuclease carboxiamidada T1 (TCAM-RNase) é TMAO > sarcosina > sacarose, conforme pode ser observado na figura 36.

E partindo dessa premissa foram realizados os experimentos com TMAO. Mediante estimulação elétrica direta, ou seja, do músculo, não se observaram diferenças significativas entre os resultados obtidos com sarcosina ou sacarose. Entretanto em feixes musculares incubados em diferentes concentrações de TMAO, submetidos a eletroestimulação do nervo (indireta), foi observado um nítido aumento da linha de base. Este aumento desloca o nível basal de relaxamento, levando a um estado de semi-contracção sustentado. Ou seja, o músculo não é capaz de relaxar totalmente. Como o aumento no nível de contracção basal foi bastante pronunciado, conseqüentemente, o abalo foi de menor magnitude, mas a amplitude máxima de contracção, que é a soma desses dois componentes (abalo e nível basal de contracção) foi maior. Este resultado corrobora com a teoria proposta por YANCEY e colaboradores (2001; 2002), e BOLEN E BASKAKOV (2001), demonstrando o TMAO ser mais efetivo na estabilização protéica, do

que outros osmólitos, como a sarcosina. Resta saber apenas, qual o local e o mecanismo de estabilização, que promovem a manutenção da força contrátil.

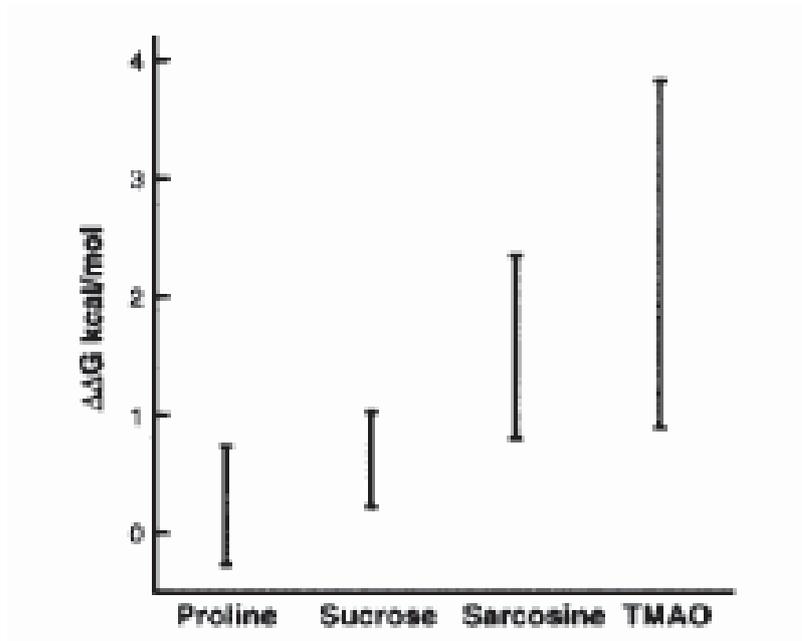


Figura 36 – Aumento na estabilidade do enovelamento da ribonuclease carboxiamidada T1 (TCAM-RNase) na presença de 1M de osmólitos em relação à estabilidade em solução sem osmólitos. As barras verticais representam o aumento da estabilização protéica (BOLEN & BASKAKOV, 2001).

Sabendo que a contração muscular é dependente dos níveis de íon cálcio intracelulares, e que para que seja atingido o completo relaxamento é necessário que os níveis citoplasmáticos de cálcio sejam diminuídos, neste caso, nem todo o cálcio pode estar sendo retirado do citoplasma ao término da contração, ou ainda, ao mesmo tempo em que o cálcio é retirado, mais cálcio adentra na célula. Isso justificaria o aumento no nível basal de contração encontrado na presença do TMAO. O TMAO poderia então estar influenciando a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, evitando que ela recaptasse todo o cálcio de volta para o retículo. Entretanto, partindo do pressuposto de que os osmólitos não atravessam a membrana celular, devido ao seu tamanho molecular, conforme observado no experimento de variação de teor hídrico em células incubadas em

solução contendo sacarose ou sarcosina, a idéia mais sugestiva seria de que o TMAO estaria atuando em nível de membrana, em alguma proteína envolvida no mecanismo de entrada de cálcio na célula. Já se sabe que o cálcio é capaz de entrar em células musculares pelo próprio receptor nicotínico, na placa motora, produzindo um aumento na concentração intracelular deste íon (ALLARD *et al.*, 1996). O TMAO poderia então estar influenciando o estado conformacional desta proteína, mantendo-a num estado conformacional que permite a entrada de cálcio, visto que o aumento no nível basal de força foi observado somente quando se estimulou o nervo e não quando a estimulação foi realizada diretamente no músculo em preparações curarizadas.

Acredita-se que o efeito dominante de estabilização do estado nativo da proteína, seja no caso do TMAO, indireto: as moléculas de TMAO ordenadas e estabilizando a estrutura da água, diminuiriam a desestabilização conformacional da proteína. O TMAO, na presença de desestabilizadores protéicos, como a uréia, ainda diminui as interações uréia-proteína e fortalece as interações uréia-água, mitigando a ação desnaturante da uréia (BENNION & DAGGETT, 2004). O TMAO também altera a camada de solvatação ao redor da proteína, aumenta o número de pontes de hidrogênio, resultando em uma estrutura protéica mais estável (BENNION *et al.*, 2004). Por essas características, o TMAO é amplamente considerado uma chaperona química, ou ainda um composto natural responsável pela indução de organização secundária e terciária em proteínas (HILL, *et al.*, 2002).

ORTIZ-COSTA e colegas (2002) realizaram um estudo sobre o efeito da uréia e metilaminas sobre a atividade ATPase da miosina. Os estudos concluem que a uréia inibe completamente a atividade ATPásica da miosina, enquanto o TMAO estimula e a betaína não exerce efeitos. E que quando combinados com uréia, tanto TMAO quanto betaína protegem a atividade ATPase da miosina contra inibição. Isso nos leva a crer que a ação estabilizante ou desestabilizante de osmólitos sobre estrutura e função protéica está intimamente relacionada à natureza do osmólito, assim como a natureza da proteína em estudo.

Para SOMERO (1986), o efeito contrastante entre a uréia e diferentes metilaminas na estrutura protéica é provavelmente devido a diferente habilidade destes solutos em penetrar ao redor da esfera de hidratação da proteína e se ligar às proteínas. Solutos como uréia, que são capazes de penetrar na barreira de hidratação e se ligar às proteínas, favorecem o desnovelamento e desestabilização protéica. Solutos estabilizadores, como as metilaminas, tendem a não se ligar a proteínas, pois são

excluídas das adjacências aquosas da superfície protéica. Essa tendência dos solutos estabilizadores de serem excluídos da organização aquosa próximo à superfície protéica se traduz em uma redução na quantidade de área de superfície protéica exposta ao solvente (água), o que é energeticamente favorável. Essa influência estabilizadora segue diretamente considerações sobre entropia da solução. O desnovelamento da proteína na presença de solutos estabilizadores iria forçar estes solutos, a dividir um reduzido volume de água, pois mais água estaria hidratando a (aumentada) área protéica. Essa desfavorável distribuição entrópica de moléculas estabilizadoras seria o principal fator responsável pelos efeitos estabilizadores na estrutura protéica (SOMERO, 1986).

Para BOLEN & BASKAKOV (2001), a diferença funcional entre uréia e osmólitos protetores, se baseia no fato da interação favorável da uréia com o eixo central peptídico, dominando sobre cadeias laterais, enquanto osmólitos protetores interagem de maneira desfavorável (osmofóbica) com o eixo central, mas favoravelmente com as cadeias laterais. As mudanças são manifestações decorrentes da energia de Gibbs de interações entre estes solutos com o eixo central e as cadeias laterais dos componentes protéicos.

As metilaminas são efetivas estabilizadoras na medula renal, onde são fundamentais para manter a estrutura protéica e ativam propriedades funcionais de certas enzimas (K_m e V_{MAX}) (GARCIA-PEREZ & BURG, 1990). É apropriado enfatizar que o acúmulo apenas de metilaminas, sem um agente desestabilizador como a uréia, por exemplo, para contrabalançar seus efeitos, pode deslocar as propriedades estruturais e funcionais de proteínas para muito longe, em direção oposta à proteínas perturbadas pela uréia. Por exemplo, efeitos altamente estabilizantes de metilaminas na estrutura protéica, podem tornar as proteínas tão rígidas que não permitem as mudanças conformacionais fundamentais para o funcionamento protéico (SOMERO, 1986). E sabe-se que a flexibilidade conformacional é essencial para as funções protéicas, como interações com ligantes e substratos, propriedades estas que são grandemente alteradas pelos osmólitos (FIELDS *et al.*, 2001). Este efeito altamente estabilizante poderia justificar o aumento no nível basal de contração encontrado nos experimentos com TMAO. Este mecanismo poderia estar engessando estados conformacionais de proteínas envolvidas na manutenção dos níveis citoplasmáticos de cálcio, bem como no processo de AEC.

Sabe-se que osmólitos aumentam a estabilidade conformacional dinâmica de proteínas, deslocando o equilíbrio entre os estados nativo e desnaturado a favor do estado nativo (KIM *et al.*, 2003). Contudo, seus efeitos no equilíbrio conformacional permanecem controversos. É difícil conciliar diferentes estudos a respeito dessa temática,

devido a questões metodológicas, pois cada trabalho usa diferentes proteínas como modelos experimentais, diferentes métodos espectroscópicos e técnicas de preparação.

Termodinamicamente, o que faz um co-solvente atuar como um estabilizador da estrutura nativa ou não, é determinado pela transferência de energia da água para o sistema solvente da proteína no estado naturalizado e desnaturado, onde a transferência de energia livre é definida como a diferença entre os potenciais químicos da proteína no sistema solvente e na água (XIE & TIMASHEFF, 1997). A conformação adotada por macromoléculas, no equilíbrio, tende a um agrupamento em torno de uma conformação do mais baixo estado de energia livre. Esta conformação representa o estado nativo da macromolécula. A manutenção da conformação que representa esse estado de mais baixa energia livre é uma importante função do solvente circundante. Isso pode ser mais bem observado em macromoléculas que em um estado purificado são instáveis e perdem sua integridade estrutural e atividade biológica (LEE & TIMASHEFF, 1981).

Na desnaturação, a superfície da proteína aumenta. Esse aumento é acompanhado de exposição de resíduos não polares antes confinados ao interior de uma proteína globular e ainda por quebra de ligações de hidrogênio de um peptídeo à outro. O resultado deste processo é um aumento na hidratação preferencial da proteína desnaturada em relação à nativa, o que vai de acordo com as mudanças observadas nas interações de desnaturação (XIE & TIMASHEFF, 1997).

Em soluções, qualquer *locus* na superfície de uma molécula protéica deve estar em contato com um componente solvente, pois um vácuo não pode ser tolerado em um meio aquoso. O estado de referência é a proteína dissolvida na água, estando completamente hidratada. Porém em um solvente binário, como exemplo uma solução acrescida de uréia, a ligação do componente não aquoso do solvente a qualquer *locus* da proteína, acaba deslocando a água que estava ao redor (TIMASHEFF, 2002). Os osmólitos estabilizam o estado nativo porque são preferencialmente excluídos da superfície protéica. A exclusão preferencial aumenta o potencial químico da proteína, proporcionalmente à sua área de superfície exposta ao solvente. Assim, os osmólitos favorecem o estabelecimento de um estado nativo mais compacto sobre a estrutura expandida de um estado desnaturado (LEE & TIMASHEFF, 1981; KIM *et al.*, 2003). Osmólitos preferencialmente excluídos também devem inibir flutuações conformacionais entre o estado nativo, pois tais movimentos são concomitantes com aumento na área de superfície exposta ao solvente da proteína (KIM *et al.*, 2003).

Em um estudo espectroscópico verificando o efeito da sacarose (1 M) sobre a estrutura secundária e terciária de três proteínas, sob condições nativas, foi demonstrado que a elipticidade protéica foi discretamente aumentada. Porém não foram observadas mudanças estruturais significantes na composição estrutural secundária. Todas as três proteínas exibiram aumento na estabilidade termodinâmica proporcional à concentração de sacarose. O estudo ainda conclui que a sacarose é capaz de deslocar o equilíbrio conformacional dentro do estado nativo, tornando a proteína mais compacta, estruturalmente mais ordenada e com menor superfície de área (KIM *et al.*, 2003). Esses fatores se explicam pela exclusão preferencial da sacarose da superfície protéica (LEE & TIMASHEFF, 1981). Já em outro estudo sobre as interações da sacarose com estabilidade protéica em três proteínas (quimiotripsina, α -quimiotripsina e ribonuclease), foi constatado que a sacarose foi capaz de alterar a interação proteína-solvente, sem induzir mudanças conformacionais protéicas. A sacarose foi preferencialmente excluída do domínio protéico, aumentando a energia livre do sistema. Termodinamicamente, isso leva a uma estabilização protéica, uma vez que o estado desnovelado da proteína se torna menos favorável na presença de sacarose. A exclusão da sacarose do domínio protéico parece estar relacionada à alta força coesiva da solução água-sacarose, visto que todas as observações experimentais podem ser relacionadas com efeitos da sacarose na superfície de tensão da água (LEE & TIMASHEFF, 1981). Estes achados vão de encontro com alguns experimentos da presente pesquisa, onde foi demonstrado que a sacarose preserva parte da força contrátil tanto em fibras intactas, na contratura induzida por cafeína, ou por alta concentração de potássio quanto em fibras permeabilizadas. Já não se pode dizer o mesmo nos experimentos envolvendo estimulação elétrica, quando comparamos sacarose com TMAO. Isso reforça a teoria proposta por BOLEN & BASKAKOV (2001) de que o TMAO seja mais efetivo que a sacarose em termos de estabilização protéica. Para os autores, a sacarose parece ter sido selecionada como osmólito em organismos sujeitos a mudanças de temperaturas extremas. Neste caso, os polióis, entre eles a sacarose, tem a habilidade de estabilizar proteínas frente a extremos de temperatura.

Já em outro trabalho, desenvolvido por RATNAPARKHI & VARADARAJAN (2001), comparou-se o efeito da sarcosina, betaína, TMAO e taurina sobre a estabilidade estrutural do complexo protéico peptídeo RNase S, usando-se cristalografia de raio-X e calorimetria triada. O maior grau de estabilidade foi obtido com sarcosina, que aumentou a temperatura de desnaturação em até 24,6 °C e protegeu a proteína contra clivagem

trítica, indicando ainda que a estabilidade promovida pela sarcosina é maior com o aumento da temperatura. Os dados suportam a teoria de que os osmólitos estabilizam proteínas, perturbando estados desnaturados, mudando a conformação para um estado mais compacto, enovelado e competente, quando na presença de osmólitos.

Sabe-se que a utilização de osmólitos orgânicos não é exclusiva do meio aquático (SOMERO, 1986). Em mamíferos, as três principais classes são os polióis (como sorbitol e inositol), aminoácidos livres (como glutamato e taurina) e as metilaminas (como glicerofosforilcolina – GPC, creatina e betaína) (GARCIA-PEREZ & BURG, 1990). Diversos estudos tem demonstrado a habilidade destes osmólitos em regular prontamente situações de estresse osmótico, tanto em condições normais, quanto patológicas, em diversos órgãos e tecidos, particularmente no cérebro, coração, olhos e rins. Isto se deve provavelmente às severas conseqüências que alterações iônicas e de volume poderiam trazer a estes órgãos. É interessante ressaltar que cada órgão utiliza diferentes combinações destes osmólitos e que esta combinação ainda é diferente nos períodos pré e pós-natal, e no decorrer da vida até a fase adulta (MILLER *et al.*, 2000).

Recentemente tem sido demonstrado que os osmólitos podem ter uma importância médica, a exemplo do TMAO que pode recuperar proteínas que sofreram um desdobramento em seu estado normal de conformação, como no caso da proteína reguladora de condutância transmembrana, envolvida no desenvolvimento da fibrose cística. (WELCH & BROWN, 1996). Esta patologia acomete diversos órgãos e tecidos, como pulmões, intestino e aparelho reprodutor, mas não acomete os rins ao menos em parte pelo acúmulo de osmólitos que ajudam a prevenir a desnaturação de proteínas (HOWARD *et al.*, 2003). Outro exemplo baseia-se em um estudo desenvolvido por BENNION e colegas (2004) em ratos, onde o TMAO é capaz de prevenir uma mudança conformacional na região N-terminal da proteína “prion” (PrP^c), que a levaria a uma conversão em uma forma mutante (PrP^{Sc}). Esta forma mutante é envolvida no surgimento de uma doença neurodegenerativa conhecida como Encefalopatia espongiforme transmissível. Foi verificado que através da adição do TMAO às células de neuroblastoma infectadas, as proteínas diminuem seu raio de giro, aumentam o número de pontes de hidrogênio e interações proteína-proteína, aumentando o número de contatos terciários e um ainda melhorando o empacotamento conformacional da estrutura do core protéico.

De acordo com BASKAKOV e colegas (1998), somente um número muito reduzido de trabalhos tem focalizado o efeito de osmólitos em funções do organismo ou tecidos que não apresentaram evolução histórica na presença de metilaminas. Para isso,

testaram o efeito do TMAO sobre a enzima lactato desidrogenase de músculo esquelético de coelhos, uma enzima que não se desenvolve na presença desta metilamina. Os resultados mostram que a K_m (constante de Michaelis-Menten) é aumentada pela uréia, retornando ao seu valor original com adição de TMAO, em proporção 2:1 uréia:TMAO. O fato de o músculo de mamífero não ter evoluído na presença de TMAO, reforça a hipótese da compensação exercida pelos osmólitos compatíveis, partindo da premissa que a compensação é inerente ao sistema uréia/osmólitos e independente da evolução histórica da proteína.

É possível, portanto, que mesmo em organismos, tecidos ou células que não apresentem fisiologicamente, ou que não estejam expostos diretamente a determinados osmólitos como sarcosina ou TMAO sejam compatíveis com essas substâncias. E esta teoria foi reforçada pelo presente estudo, que demonstra que células musculares de mamíferos são capazes de manter sua produção de força, mesmo incubadas em soluções contendo diferentes osmólitos, como sacarose, sarcosina, e TMAO, dependendo da concentração utilizada. Entretanto, cada osmólito exibe características peculiares, apresentando uma diferente manifestação em relação a esta manutenção de força. Isso sugere que os osmólitos apresentam diferentes graus de estabilização sobre a estrutura das proteínas envolvidas no mecanismo de AEC. Entretanto ainda há muito o que se desvendar sobre os efeitos dos osmólitos nas diferentes funções orgânicas, assim como os mecanismos envolvidos em cada situação.

7. CONCLUSÕES

O osmólito de ocorrência natural “sarcosina” parece ser compatível com a espécie estudada, em especial com tecido muscular esquelético, uma vez que é capaz de manter a contração do músculo diafragma e ílio-psoas. Tais efeitos são observados quando este osmólito é empregado em baixas concentrações (até 100 mM). Em feixes de músculo diafragma submetidos a eletroestimulação neuromuscular, a sarcosina (5, 10 e 50 mM) foi capaz de manter grande parte da força contrátil. O mesmo efeito não foi observado em feixes expostos à sacarose.

A sarcosina, quando empregada em altas concentrações (maiores que 100 mM), assim como a sacarose, pode tornar-se incompatível com a vida, uma vez que diminui amplamente a contração do músculo. A modificação da resposta contrátil parece ser ocasionada pela própria tonicidade do meio, uma vez que não há diferenças significativas na produção de força obtida com o aumento da tonicidade via sacarose ou sarcosina. Este decréscimo na produção de força é, entretanto, reversível, uma vez que as células recuperam a capacidade normal de produção de força, após retornarem às soluções isotônicas. Isto reforça a teoria de que a sarcosina possa ser um osmólito compatível com mamíferos, não apresentando efeitos deletérios sobre a contração muscular.

A sarcosina sugere não induzir liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, uma vez que não potencializa a contratura obtida em fibras permeabilizadas. Por outro lado, também não diminui este processo. Já na contratura potássica, a sarcosina (50 mM) é capaz de incrementar a produção de força e ainda produzir uma contratura “per se” em solução relaxante. O TMAO, diferentemente da sarcosina, é capaz de potencializar grandemente a contração induzida por estímulo elétrico indireto, mesmo quando utilizado em concentrações mais elevadas (300 mM).

Acredita-se que o efeito dos osmólitos seja sobre a estabilidade de estruturas e funções protéicas envolvidas na transmissão neuromuscular e no AEC. Os osmólitos (sarcosina e TMAO), possuem um coeficiente de reflexão próximo a um, portanto não permeiam a membrana. Os mesmos parecem por conseguinte, estar atuando em nível de proteínas da membrana. É possível que a sarcosina, em baixas concentrações esteja estabilizando proteínas envolvidas na transmissão neuromuscular e no AEC, como os receptores DHP, uma vez que demonstra efeitos potencializadores sobre a contratura potássica e mantém a força de contração induzida por eletroestimulação. Já o efeito do TMAO parece ser em nível de placa motora, uma vez que o aumento da tensão basal é

bloqueado pela adição de d-tubocurarina. E com esta investigação sugere-se que o TMAO seja mais eficaz que a sarcosina na manutenção de estados conformacionais protéicos que favoreçam o AEC, promovendo a contração muscular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M. M. (1999). *Fisiologia*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 934 p.

ALLARD, B.; BERNENGO, J. C.; ROUGIER, O. & JACQUEMOND, V. (1996). Intracellular Ca^{2+} changes and Ca^{2+} -activated K^+ channel activation induced by acetylcholine at the endplate of mouse skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology-London*. **494**, 337-349.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; MARTIN, R.; ROBERTS, K. & WATSON, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. 3. ed. New York: Garland Publishing Inc. 1294 p.

ALTRINGHAM, J. D.; YANCEY, P. H.; & JOHNSTON, I. A. (1982). The effects of osmoregulatory solutes on tension generation by dogfish skinned muscle fibres. *J.Exp.Biol.* **96**, 443-445.

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

ASHLEY, C. C.; MULLIGAN, I. P.; & LEA, T. J. (1991). Ca^{2+} and Activation Mechanisms in Skeletal Muscle. *Q.Rev.Biophys.* **24**, 1-73.

ÁVILA, G.; LEE, E. H.; PEREZ, C. F.; ALLEN, P. D.; DIRKSEN, R. T. (2003). FKBP12 Binding to RyR1 modulates excitation-contraction coupling in mouse skeletal myotubes. *J.Biol.Chem.* **278**, 22600-22608.

BAGNASCO, S. M. (2000). How renal cells handle urea. *Cell Physiol. Biochem.* **10**, 379-384.

BALABAN, R. S. & KNEPPER, M. A. (1983). Nitrogen-14 nuclear magnetic resonance spectroscopy of mammalian tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **245**, C439-C444.

BASKAKOV, I.; WANG, A. & BOLEN, D. W. (1998). Trimethylamine-N-Oxide counteracts urea effects on rabbit muscle lactate dehydrogenase function: a test of the counteraction hypothesis. *Biophysical Journal*. **74**, 2666-2673.

BEDFORD, J. J.; HARPER, J. L.; LEADER, J. P.; YANCEY, P. H. & SMITH, R. A. J. (1998). Betaine is the principal counteracting osmolyte in tissues of the elephant fish, *Callorhincus millii* (Elasmobranchii, Holocephali). *Comparative Biochemistry and Physiology*. **119**, 521-526.

BENNION, B. J. & DAGGETT, V. (2004). Counteraction of urea-induced protein denaturation by trimethylamine N-oxide: a chemical chaperone at atomic resolution. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **101**, 6433-6438.

BENNION, B. J.; DEMARCO, M. L. & DAGGETT, V. (2004). Preventing misfolding of the prion protein by trimethylamine N-Oxide. *Biochemistry* **43**, 12955 – 12963.

BERNE, R. M. & LEVI, M. N. (2004). *Fisiologia*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1074p.

BERS, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. **415**, 198-205.

BERS, D. M.; LEDERER, W. J.; & BERLIN, J. R. (1990). Intracellular Ca²⁺ transients in rat cardiac myocytes: role of Na-Ca exchange in excitation-contraction coupling. *Am.J.Physiol.* **258**, C944-C954.

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

BOLEN, D. W. & BASKAKOV, I. V. (2001). The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J. Mol. Biol.* **310**, 955-963.

BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. (1979). Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. *J. Exp. Zoology.* **208**, 137-152.

BRENNER, B. (1986). The cross-bridge cycle in muscle. Mechanical, biochemical, and structural studies on single skinned rabbit psoas fibers to characterize cross-bridge kinetics in muscle for correlation with the actomyosin-ATPase in solution. *Basic Res.Cardiol.* **81**, 1-15.

BRENNER, B. (1988). Effect of Ca²⁺ on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fiber: Implications for regulation of muscle contraction. *Proceedings of the Nat.Acad. of Sciences of the USA* **85**, 3265-3269.

BRENNER, B. (1991). Muscle Mechanics and Biochemical Kinetics. In *Molecular Mechanisms in Muscular Contraction*, ed. Squire, J. M., pp. 77-149. CRC Press, Inc., Boca Raton.

BURG, M. B.; PETERS, E. M. (1997). Urea and methylamines have similar effects on aldose reductase activity. *Am. J. of Physiol.* **273**, F1048 – F1053.

CANNON, W.B. (1932). *The Wisdom of the Body*. New York, NY: Norton 1932.

CAPUTO, C. (1968). Volume and twitch tension changes in single muscle fibers in hypertonic solutions. *The Journal of General Physiology.* **52**, 793 – 809.

CHANDLER, W. K.; RAKOWSKI, R. F. & SCHNEIDER, M. F. (1976). Effects of glycerol treatment and maintained depolarisation on charge movement in skeletal muscle. *J. Physiol.* **254**, 285 – 316.

CHAWLA, S.; SKEPPER, J. N.; HOCKADAY, A. R. & HUANG, C. L. (2001). Calcium waves induced by hypertonic solutions in intact frog skeletal muscle fibres. *J Physiol* **536**, 351-359.

CONSTANZO, J. P. & LEE-JR., R. E. (2005). Protection by urea in a terrestrially hibernation frog. *The Journal of Experimental Biology* **208**, 4079-4089.

COUTINHO, S.; BRAGA, D. & SUAREZ, K. (1982). Effects of hypertonicity on frog muscle contractures induced by quinine. *Braz J Med Biol Res* **15**, 275-280.

DELAY, M.; RIBALET, B. & VERGARA, J. (1986). Caffeine potentiation of calcium release in frog skeletal muscle fibres. *J.Physiol.(London)* **375**, 535-559.

DIRKSEN, R. T. (2002). Bi-directional coupling between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors. *Front Biosci* **7**, d659-d670.

DULHUNTY, A. F.; HAARMANN, C. S.; GREEN, D.; LAVER, D. R.; BOARD, P. G. & CASAROTTO, M. G. (2002). Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **79**, 45–75.

EDMAN, K. A. & HWANG, J. C. (1977). The force-velocity relationship in vertebrate muscle fibres at varied tonicity of the extracellular medium. In: Hipertonicity and force development in frog skeletal muscle fibres. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **61**, 847 – 856.

FABIATO, A. (1981). Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an intact isolated cardiac cell and during calcium-induced release of calcium from the

sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from the adult rat or rabbit ventricle. *Journal of General Physiology* **78**, 457-497.

FABIATO, A. (1992). Two kinds of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* **311**, 245-262.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978). Effect of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J.Physiol.(London)* **276**, 233-255.

FELDER, E.; PROTASI, F.; HIRSCH, R.; FRANZINI, A. & ALLEN, P. D. (2002). Morphology and molecular composition of sarcoplasmic reticulum surface junctions in the absence of DHPR and RyR in mouse skeletal muscle. *Biophys J.* **82**, 3144-3149.

FIELDS, P. A.; WAHLSTRAND, B. D. & SOMERO, G. N. (2001). Intrinsic versus extrinsic stabilization of enzymes: the influence of solutes and temperature on A4-lactate dehydrogenase orthologs from warm-adapted and cold-adapted marine fishes. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4497-4505.

FILL, M. D. & BEST, P. M. (1989). Block of contracture in skinned frog skeletal muscle fibers by calcium antagonists. *Journal of General Physiology* **93**, 429-449.

FINCH, E. A.; TURNER, T. J. & GOLDIN, S. M. (1991). Calcium As a Coagonist of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Induced Calcium Release. *Science.* **252**, 443-446.

FLICKER, P. F.; PHILLIPS, G. N.; & COHEN, C. Troponin and its interactions with tropomyosin. An Electron microscope study. *J.Mol.Biol.* **162**, 495-501.

FOGAÇA, R. T. H.; CAVALCANTE, A. D. A.; SERPA, A. K. L.; SOUSA, P. J. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. & LEAL-CARDOSO, J. H. (1997). The effects of essential oil of *Mentha x villosa* on skeletal muscle of the toad. *Phytoter.Res.* **11**, 552-557.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. & NUNZI, G. (1983). Junctional feet and particles in the triads of a fast-twitch muscle fibre. *J. Musc. Res. Cell Motil.* **4**, 233-252.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. & PROTASI, F. (1997). Ryanodine receptors of striated muscle: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol.Rev.* **77**, 699-729.

GARCIA-PEREZ, A. & BURG, M. B. (1990). Importance of organic osmolytes for osmoregulation by renal medullary cells. *Hypertension* **16**, 595-602.

GARRET, R. H. & GRISHAN, C. M. (1995). Muscle contraction. In: *Molecular aspects of cell Biology*. Orlando: Saunders College Publishing. 1156-1176.

GODT, R. E.; FOGACA, R. T. H.; ANDREWS, M. A. & NOSEK, T. M. (1993). Influence of ionic strength on contractile force and energy consumption of skinned fibers from mammalian and crustacean striated muscle. *Adv Exp Med Biol*. **332**, 763-773.

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

GODT, R. E.; KIRBY, A. C. & GORDON, A. M. (1984). Effects of hypertonic solutions on contraction of frog tonic muscle fibers. *Am J Physiol*. **246**, C148-C153.

GODT, R. E. & LINDLEY, B. D. (1982). Influence of temperature upon contractile activation and isometric force production in mechanically skinned muscle fibers of the frog. *Journal of General Physiology*. **80**, 279-297.

GORDON, A. M. & GODT, R. E. (1970). Some effects of hypertonic solutions on contraction and excitation-contraction coupling in frog skeletal muscles. *The Journal of General Physiology*. **55**, 254-275.

GORDON, A. M.; GODT, R. E.; DONALDSON, S. K. B. & HARRIS, C. E. (1973). Tension in skinned frog muscle fibers in solutions of varying ionic strength and neutral salt composition. *The Journal of General Physiology*. **62**, 550 - 574.

GUTH, K. & POTTER, J. D. (1987). Effect of rigor and cycling cross-bridges on the structure of troponin C and on the Ca²⁺ affinity of the Ca²⁺-specific regulatory sites in skinned rabbit psoas fibers. *J.Biol.Chem*. **262**, 13627-13635.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. (2002). *Tratado de Fisiologia Médica*. 10^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 973 p.

GYÖRKE, S. & PALADE, P. (1992). Calcium-induced calcium release in crayfish skeletal muscle. *J.Physiol.(London)* **457**, 195-210.

HAMILTON, S. L.; SERYSHEVA, I. & STRASBURG, G. M. (2000). Calmodulin and Excitation-Contraction Coupling. *News Physiol. Sci*. **15**, 281-284.

HAND, S. C. & SOMERO, G. N. (1982). Urea and methylamine effects on rabbit muscle phosphofructokinase. *The Journal of Biological Chemistry*. **257**, 734-741.

HEUSER, J. E. & REESE, T. S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Cell Biology* **57**, 315-344.

HILL, C. M.; BATES, I. R.; WHITE, G. F.; HALLETT, F. R. & HARAUZ, G. (2002). Effects of the osmolyte trimethylamine N-oxide on conformation, self-association, and two-dimensional crystallization of myelin basic protein. *Journal of Structural Biology* **139**, 13-26.

HOCHACHKA, P. W. & SOMERO, G. N. (2002). Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution. *Oxford University Press*.

HOMSHER, E., BRIGGS, F. N., & WISE, R. M. (1974). Effects of hypertonicity on resting and contracting frog skeletal muscles. *Am J Physiol* **226**, 855-863.

HORNER, W. H. & MACKENZIE, C. G. (1950). The biological formation of sarcosine. *J. Biol. Chem* **187**, 15 - 22.

HOWARD, M.; FISCHER, H.; ROUX, J.; SANTOS, B. C.; GULLANS, S. R.; YANCEY, P. H. & WELCH, W. J. (2003). Mammalian osmolytes and S-nitrosoglutathione promote $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein maturation and function. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**, 35159-35167.

IBARRA-MOLERO, B.; PLAZA DEL PINO, I. M.; SOUHAIL, B.; HAMMOU, H. O. & SANCHEZ-RUIZ, J. M. (2000). The sarcosine effect on protein stability: a case of nonadditivity? *Protein Science* **9**, 820 – 826.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. (1999). *Histologia básica*. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 427 p.

KELLY, R. H. & YANCEY, P. H. (1999). High contents of trimethylamine oxide correlating with depth in deep-sea teleost fishes, skates, and decapod crustaceans. *Biol. Bull.* **196**, 18-25.

KONISHI, M. & KURIHARA, S. (1987). Effects of caffeine on intracellular calcium concentrations in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (London)* **383**, 269-283.

KÜLTZ, D. & CHAKRAVARTY, D. (2001). Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 1999-2004.

LACAMPAGNE, A.; KLEIN, M. G.; WARD, C. W. & SCHNEIDER, M. F. (2000). Two mechanisms for termination of individual Ca²⁺ sparks in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7823-7828

LAMB, G. D. (2000). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **27**, 216-224.

LAMB, G. D. & STEPHENSON, D. G. (1990). Calcium release in skinned muscle fibres of the toad by transverse tubule depolarization or by direct stimulation. *J Physiol* **423**, 495-517.

LAMB, G. D. (2002). Voltage-sensor control of Ca²⁺ release in skeletal muscle: insights from skinned fibers. *Front Biosci* **7**, d834-d842.

LAMB, G. D.; EL, H.; IKEMOTO, N. & STEPHENSON, D. G. (2000). Effects of dihydropyridine receptor II-III loop peptides on Ca²⁺ release in skinned skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C891-C905.

LAMB, G. D.; POSTERINO, G. S.; YAMAMOTO, T. & IKEMOTO, N. (2001). Effects of a domain peptide of the ryanodine receptor on Ca²⁺ release in skinned skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C891-C905.

LANG, F.; BUSCH, G. L.; RITTER, M.; VÖLKL, H.; WALDEGGER, S.; GULBINS, E. & HÄUSSINGER, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*, **78**, 248-306.

LAUNIKONIS, B. S. & STEPHENSON, D. G. (1997). Effect of saponin treatment on the sarcoplasmic reticulum of rat, cane toad and crustacean (yabby) skeletal muscle. *Journal of Physiology*. **504**, 425-437.

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

LEE, J. C. & TIMASHEFF, S. N. (1981). The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* **256**, 7193 – 7201.

LÓPEZ, J. R. & TERZIC, A. (1996). Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release is regulated by cytosolic Ca²⁺ in intact skeletal muscle. *Pflügers Arch.Eur.J. Physiol.* **432**, 782-790.

LUNKMOSS, G. (2002). Efeitos de soluções hipertônicas ajustadas com óxido de trimetilamina (TMAO), sacarose, betaína ou cloreto de sódio no processo de acoplamento excitação-contração de músculo esquelético de rã. *Dissertação de mestrado*. Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná. 79p.

KIM, Y.; JONES, L. S.; DONG, A.; KENDRICK, B. S.; CHANG, B. S.; MANNING, M. C.; RANDOLPH, T. W. & CARPENTER, J. F. (2003). Effects of sucrose on conformational equilibria and fluctuations within the native state ensemble of proteins. *Protein Science*. **12**, 1252 - 1261.

KWON, E. D.; DOOLEY, J. A.; JUNG, K. Y.; ANDREWS, A.; GARCÍA-PÉREZ, A. & BURG, M. B. (1996). Organic osmolyte distribution and levels in the mammalian urinary bladder in diuresis and antidiuresis. *Am. J. Physiol.* **271**, F230-F233.

MACMILLEN, R. E. & LEE, A. K. (1967). Australian desert mice: independence of exogenous water. *Science* **158**, 383-385.

MEISSNER, G.; LAI, F. A.; ANDERSON, K.; XU, L.; LIU, Q.Y.; HERRMANN-FRANK, A.; ROUSSEAU, E.; JONES, R. V. & LEE, H. B. (1991). Purification and reconstitution of the ryanodine and caffeine sensitive Ca^{2+} release channel complex from muscle sarcoplasmic reticulum. *Adv.Exp.Med.Biol.* **304**, 241-256.

MILLER, T. J.; HANSON, R. D. & YANCEY, P. H. (2000). Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **125**, 45-56.

MILLEVOI, S.; TROBITAS, K.; KOLMERER, B.; SCHAPER, J.; PELIN, K.; GRANZIER, H.; LABEIT, S. (1998). Characterization of nebulite and nebuline and emerging concepts of their roles for vertebrate z-discs. *J. Mol. Biol.* **282**:1, 111-123

MISSIAEN, L.; DE SMEDT, H.; DROOGMANS, G. & CASTEELS, R. (1992). Ca^{2+} release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca^{2+} in permeabilized cells. *Nature* **357**, 599-602.

MOSS, R. L. & HOFMANN, P. A. (1992). Cellular and molecular basis of muscle contraction. *Fundamental of Medical Cell Biology*. **5B**. 185-237.

ORTIZ-COSTA, S.; SORENSON, M. M. & SOLA-PENNA, M. (2002). Counteracting effects of urea and methylamines in function and structure of skeletal muscle myosin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **408**, 272-278.

- PARKER, I. & ZHU, P. H. (1987). Effects of hypertonic solutions on calcium transients in frog twitch muscle fibres. *J Physiol* **383**, 615-627.
- PERES, A.; RACCA, C.; BERTOLLINI, L. & STURANI, E. (1991). Cytosolic Calcium Responses Induced by Photolytic Release of 1,4, 5-Inositol Trisphosphate in Single Human Fibroblasts. *Biochim.Biophys.Acta.* **1092**, 89-93.
- PIAZZESI, G.; LINARI, M. & LOMBARDI, V. (1994). The effect of hypertonicity on force generation in tetanized single fibres from frog skeletal muscle. *J Physiol* **476**, 531-546.
- POSTERINO, G. S. & LAMB, G. D. (1998). Effect of nifedipine on depolarization-induced force responses in skinned skeletal muscle fibres of rat and toad. *J.Muscle Res.Cell Motil.* **19**, 53-65.
- PRADEEP, L. & UDGAONKAR, J. B. (2004). Osmolytes induce structure in an early intermediate on the folding pathway of barstar. *JBC Papers in Press.* 2 – 37.
- PROTASI, F. (2002). Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front Biosci* **7**, d650-d658.
- QUINN, K. E.; CASTELLANI, L.; ONDRIAS, K. & EHRLICH, B. E. (1998). Characterization of the ryanodine receptor/channel of invertebrate muscle. *Am.J.Physiol.* **274**, R494-502.
- RIOS, E. & BRUM, G. (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature.* **325**. 717-720.
- RIOS, E. & PIZZARRO, G. (1991). Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiological reviews.* **71**, 849 – 908.
- RIOS, E.; MA, J. & GONZALEZ, A. (1991). The Mechanical Hypothesis of Excitation Contraction (EC) Coupling in Skeletal Muscle. *J.Muscle.Res.Cell.Motil.* **12**, 127-135.
- ROJAS, E.; NASSAR-GENTINA, V.; POLLARD, M. E. & LUXORO, M. (1992). Mechanisms of calcium release from terminal cisternae in Crustacean muscle. *Adv.Exp.Med.Biol.* **311**, 305-317.
- RÖSGEN, J.; PETTITT, B. M. & BOLEN, D. W. (2005). Protein folding, stability and solvation structure in osmolyte solutions. *Biophys J.* Disponível em <www.biophysj.org>, acesso em 26/10/2005.

- ROUSSEAU, E. & MEISSNER, G. (1989). Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel: activation by caffeine. *Am.J.Physiol.* **256**, H328-H333.
- RUSSO, A. T.; RÖSGEN, J. & BOLEN, D. W. (2003). Osmolyte effects on kinetics of FKBP12 C22A folding coupled with prolyl isomerization. *J. Mol. Biol.* **330**, 851-866.
- SAITO, A.; INUI, M.; RADERMACHER, M.; FRANK, J. & FLEISCHER, S. (1988). Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **107**, 211-219.
- SATO, Y. & FUJINO, M. (1987). Hypertonicity-induced inhibition of excitation-contraction coupling in *Xenopus* twitch fibers. *Jpn J Physiol* **37**, 947-953.
- SCHNEIDER, M. F. (1994). Control of Calcium Release In Functioning Skeletal Muscle Fibers. *Annual Review of Physiology* **56**, 463-484.
- SCHNEIDER, M. F. & CHANDLER, W. K. (1973). Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* **242**, 244-246.
- SEKIGUCHI, T. & SHIMIZU, H. (1987). Caffeine-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum of a skeletal muscle. *J.Pharmacobiodyn.* **10**, 55-62.
- SHOSHAN-BARMATZ, V. & ASHLEY, R. H. (1998). The structure, function and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels. *International Review of Cytology.* **183**, 185-271.
- SOMERO, G. (1986). From dogfish to dogs: trimethylamines protect proteins from urea. *News in Physiology Sciences.* **1**, 9-12
- STEELE, S. L.; YANCEY, P. H. & WRIGHT, P. A. (2004). Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: osmoregulation during early embryonic development in the marine little skate *Raja erinacea*; response to changes in external salinity. *The Journal of Experimental Biology.* **207**, 2021 – 2031.
- SU, J. Y. & CHANG, Y. I. (1993). Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channels by caffeine, Ca²⁺, and Mg²⁺ in skinned myocardial fibers of fetal and adult rats. *Pflugers Arch.* **423**, 300-306.
- SUAREZ-KURTZ, G. & SORENSON, A. L. (1977a). Effects of verapamil on excitation-contraction coupling in single crab muscle fibers. *Pflugers Arch* **368**, 231-239.

SUAREZ-KURTZ, G. & SORENSON, A. L. (1977b). Inhibition by hypertonic solutions of Ca-dependent electrogenesis in single crab muscle fibers. *J Gen Physiol* **70**, 491-505.

TAKEKURA, H. & FRANZINI, A. (1999). Correct targeting of dihydropyridine receptors and triadin in dystopic mouse skeletal muscle in vivo. *Dev Dyn* **214**, 372-380.

TALON, S.; HUCHET, C. & LEOTY, C. (2000). Rapid cooling-induced contractures in rat skinned skeletal muscle fibres originate from sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol trisphosphate receptors. *Pflugers Arch* **441**, 108-117.

TIMASHEFF, S. N. (2002). Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Biochemistry)*. **99**, 9721-9726.

VALDIVIA, C.; VAUGHAN, D.; POTTER, B. V. L. & CORONADO, R. (1992). Fast release of ⁴⁵Ca²⁺ induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and Ca²⁺ in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle: Evidence for two types of Ca²⁺ release channels. *Biophys.J.* **61**, 1184-1193.

VAUGHAN, P. C.; BRESSLER, B. H.; DUSIK, L. A. & TROTTER, M. J. (1983). Hypertonicity and force development in frog skeletal muscle fibres. *Can J Physiol Pharmacol* **61**, 847-856.

VERGARA, J.; TSIEN, R. Y. & DELAY, M. (1985). Inositol 1,4,5-trisphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **82**, 6352-6356.

VOLPE, P.; SALVIATI, G.; DE VIRGILLO, F. & POZZAN, T. (1985). Inositol 1,4,5 triphosphate induced calcium release form sarcoplasmic reticulum. *Nature* **316**, 347-349.

WAGENKNECHT, T.; GRASSUCCI, R.; FRANK, J.; SAITO, A.; INUI, M. & FLEISCHER, S. (1989). Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature*. **338**, 167-170.

WELCH, W. J. & BROWN, C. R. (1996). Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones*. **1**, 109-115.

WITHERS, P. C. & GUPPY, M. (1996). Do Australian desert frogs co-accumulate counteracting solutes with urea during aestivation? *The Journal of Experimental Biology*. **199**, 1809 – 1816.

WITHERS, P. C.; MORRISON, G.; HEFTER, G. T. & PANG, T. (1994). Role of urea and methylamines in buoyancy of elasmobranchs. *J. Exp. Biol.* **188**, 175 – 189.

WOLSKA, B. M. & LEWARTOWSKI, B. (1993). The role of sarcoplasmic reticulum and Na-Ca exchange in the Ca²⁺ extrusion from the resting myocytes of guinea-pig heart: Comparison with rat. *J.Mol.Cell.Cardiol.* **25**, 75-91.

XIE, G. & TIMASHEFF, S. N. (1997). Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein. *Protein Science.* **6**, 211 - 221.

YANCEY, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of Experimental Biology* **208**, 2819-2830.

YANCEY, P. H.; BLAKE, W. R. & CONLEY, J. (2002). Unusual organic osmolytes in deep-sea animals: adaptations to hydrostatic pressure and other perturbants. *Comparative Biochemistry and Physiology.* **133**, 667-676.

YANCEY, P. H.; CLARK, P. H.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D. & SOMERO, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.

YANCEY, P. H. & SOMERO, G. N. (1979). Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochem J* **183**, 317-323.

YOUXING, Q.; BOLEN, C. L. & BOLEN, D. W. (1998). Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 9268 – 9273.

ZAMPRONI, L. N. & FOGAÇA, R. T. H.; Efeitos de soluções hipertônicas ajustadas com Sacrose ou Óxido de Trimetilamônio (TMAO) sobre a junção neuromuscular e o acoplamento excitação-contração de vertebrados. (2004). *Relatório Técnico-Científico Final (CNPQ)*, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 26 p.

ZHU, Y. & NOSEK, T. M. (1992). Ruthenium red affects the contractile apparatus but not sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release of skinned papillary muscle. *Pflügers Arch.* **420**, 255-258.

ZOU, Q.; BENNION, B. J.; DAGGETT, V. & MURPHY, K. P. (2002). The molecular mechanism of stabilization of proteins by TMAO and its ability to counteract the effects of urea. *J Am Chem Soc* **124**, 1192-1202.