

ANA PAULA OLIVEIRA RODRIGUES

**ESTUDO DOS EFEITOS DE OSMÓLITOS DE OCORRÊNCIA NATURAL
“BETAÍNA E ÓXIDO DE TRIMETILAMINA” NA TRANSMISSÃO
NEUROMUSCULAR, NA JUNÇÃO MIONEURAL E NO PROCESSO DE
ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO DE MÚSCULO ESTRIADO
ESQUELÉTICO DE MAMÍFERO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR. Orientador: Prof. Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil.

CURITIBA

2006

ANA PAULA OLIVEIRA RODRIGUES

**ESTUDO DOS EFEITOS DE OSMÓLITOS DE OCORRÊNCIA NATURAL
“BETAÍNA E TMAO” NA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR, NA JUNÇÃO
MIONEURAL E NO PROCESSO DE ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO
DE MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE MAMÍFERO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR. Orientador: Prof. Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil.

CURITIBA

2006

À minha mãe Ana e
irmãs Ana Ruth e Ana Cláudia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, amor e alegria de estar prosseguindo nesta caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rosalvo Tadeu Homchmuller Fogaça pela amizade e por ter me ensinado que a ciência não se faz em poucas horas, mas sim em investigação científica rica na observação e experimentação, com perseverança e muita dedicação. E principalmente, pela sua paciência comigo.

À Prof^a Dr^a Ilana Kassouf Silva e Prof. Dr. Carlos E.N. Damiani pelas suas orientações durante estes dois anos de laboratório.

Aos colegas de laboratório Marcos, Laura e Fernando pela amizade, companheirismo e pelo auxílio na realização dos experimentos.

À minha mãe e familiares pela educação, apoio e por acreditarem em mim.

Ao meu companheiro e amigo Maurício Staude e sua família pela paciência e apoio.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Quadros	xi
Lista de Tabelas	xii
Resumo	xiii
Summary	xiv
INTRODUÇÃO	01
1.1 Acoplamento Excitação-Contração	02
1.1.1 AEC no Músculo Esquelético	03
1.1.2 Bases moleculares do AEC	06
1.2 Efeitos da Hipertonicidade sobre o AEC de Músculo Estriado Esquelético	16
1.3 Osmólitos Naturais	18
II. OBJETIVOS	21
III. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Materiais	22
3.1.1. Drogas e Reagentes	23
3.2. Métodos	24
3.2.1. Músculo Intacto	24
3.2.2. Fibra muscular desmembranada com uso de saponina	28
3.3. Estatística	31
IV. RESULTADOS	33
4.1. Efeito da betaína e sacarose na contração muscular induzida por potássio	33
4.2. Efeito da betaína e sacarose sobre a contração cafeínica	36
4.3. Efeito da betaína e sacarose na produção de força muscular induzida por EEI	39

4.3.1. Efeito da exposição súbita de 300 mM de betaína ou sacarose na produção de força muscular induzida por EEI	43
4.4. Efeito da betaína e sacarose na produção de força muscular induzida por EED	46
4.4.1. Efeito da exposição súbita de 300 mM de betaína ou sacarose na produção de força muscular induzida por EED	48
4.5. Efeito do TMAO na produção de força muscular induzida por EEI	51
4.6. Efeito do TMAO na produção de força muscular induzida por EED.....	56
4.7. Efeito da betaína e da sacarose em fibra muscular esquelética desmembranada com uso de saponina	58
V. DISCUSSÃO	62
VI. CONCLUSÃO	72
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	acetilcolina
AEC	acoplamento excitação-contração
apoCaM	calmodulina livre de cálcio
Asp	ácido aspártico
ATP	trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	íon cálcio
Ca ²⁺ CaM	cálcio ligado à calmodulina
CaCl ₂	cloreto de cálcio
Caf.	cafeína
CaM	calmodulina
CaMK	calmodulina proteína quinase
CSQ	calsequestrina
CICR	liberação de cálcio induzida por cálcio
Cl ⁻	íon cloreto
CTD	domínio carboxi-terminal
DHPR	receptor dihidropiridínico
DTB	d- tubocurarina
EGTA	ácido etileno-bis(β-amino-etil-éter-N,N,N',N'-tetracético)
EED	estimulação elétrica direta
E EI	estimulação elétrica indireta
F _{máx}	força máxima
Glu	ácido glutâmico
IP ₃	trifosfato de inositol

IP ₃ R	receptor de trifosfato de inositol
K ⁺	íon potássio
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilodalton
KMSO ₄	metanossulfonato de potássio
Mg ²⁺	íon magnésio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
Na ⁺	íon sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NTD	domínio amino-terminal
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor rianodínico
SERCA	bomba de Ca ²⁺ /ATPase do retículo sarcoplasmático
Sol.	solução
TMAO	óxido de trimetilamina
TnC	troponina C

LISTA DE FIGURAS

Fig.1. Tríade juncional	04
Fig.2. Seqüência do Acoplamento Excitação-Contração.....	05
Fig.3. Receptor DHPR de músculo esquelético	07
Fig.4. Receptor DHPR de músculo cardíaco	08
Fig.5. Receptor Rianodínico.....	09
Fig.6. Interações proteína-proteína no retículo sarcoplasmático	10
Fig.7. Calmodulina	11
Fig.8. Interação triadina - RyR	13
Fig.9. Interação DHPR-RyR	14
Fig.10. Registro original de um experimento de contração potássica	34
Fig.11.Efeito de soluções hipertônicas na produção de força muscular induzida por substituição isotônica de NaCl por KCl (100 mM)	35
Fig.12. Registro original de um experimento de produção de força muscular induzida por cafeína	37
Fig.13. Efeito de soluções hipertônicas ajustadas com betaína ou sacarose na contração muscular induzida pela cafeína (3 mM)	38
Fig.14. Registro original de experimento de contração muscular induzida por EEI em solução contendo sacarose	40
Fig.15. Registro original de experimento de contração muscular induzida por EEI em solução contendo betaína	41
Fig.16. Efeito de soluções hipertônicas ajustadas com betaína ou sacarose na produção de força muscular induzida por EEI	42
Fig.17. Registros originais de experimentos de produção de força muscular induzida por EEI na exposição súbita de 300 mM de betaína ou sacarose	44
Fig.18. Efeito da betaína e sacarose (300 mM) na contração muscular induzida por EEI.....	45
Fig.19. Efeito da betaína e sacarose na produção de força muscular induzida por EED.....	47
Fig.20. Registros originais de experimentos de produção de força muscular induzida por EED na exposição súbita de 300 mM de betaína ou sacarose	49
Fig.21. Efeito da betaína e da sacarose (300 mM) na produção de força muscular induzida por EED	50
Fig.22. Registro original de experimento de contração muscular induzida por EEI em soluções com TMAO	52

Fig.23. Efeito do TMAO e da sacarose na contração basal de experimento de contração muscular induzida por EEI	53
Fig.24. Efeito do TMAO e da sacarose no abalo muscular induzida por EEI	54
Fig.25. Efeito do TMAO e da sacarose na amplitude máxima de contração muscular induzida por EEI	55
Fig.26. Efeito do TMAO e da sacarose na produção de força muscular induzida por EED	57
Fig.27 Registro original de um experimento de fibra muscular esquelética desmembranada com uso de saponina	59
Fig.28. Efeito da betaína e sacarose na produção de força muscular de fibra desmembranada com saponina (Representação gráfica com dados normalizados em relação à cafeína 30 mM)	60
Fig.29. Efeito da betaína e sacarose na produção de força muscular de fibra desmembranada com saponina (Representação gráfica com dados normalizados em relação à cafeína 3 mM)	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Drogas e Reagentes	23
Quadro 2. Protocolo de contração potássica	25
Quadro 3. Protocolo de contração cafeínica	26
Quadro 4. Protocolo de contração muscular induzida por EEI	27
Quadro 5. Protocolo de contração muscular induzida por EEI (exposição súbita de fibra muscular à 300 mM de soluto)	27
Quadro 6. Protocolo de contração induzida por estimulação elétrica direta	28
Quadro 7. Protocolo de contração muscular induzida por EED (exposição súbita de fibra muscular à 300 mM de soluto)	28
Quadro 8. Protocolo de fibra desmembranada com uso de saponina	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Duração das Fases do AEC em músculo esquelético	06
Tabela 2. Composição das soluções empregadas em experimentos com fibra desmembranada	31
Tabela 3. Produção de força muscular induzida por EEI	39
Tabela 4. Produção de força muscular induzida por EED	46

INTRODUÇÃO

Diversos organismos submetidos a situações de estresse de água acumulam intra e extracelularmente osmólitos naturais, como o óxido de trimetilamina (TMAO), betaína, sarcosina, taurina, entre outros (Yancey *et al.*, 1982). O aumento da tonicidade do meio extracelular promove movimento de água para fora da célula com resultante aumento da força iônica intracelular promovendo redução na produção de força muscular pelo aparato contrátil (Vaughan *et al.*, 1983; Gordon & Godt, 1970). O processo de acoplamento excitação-contração (AEC) é provavelmente, uma das etapas afetadas por soluções hipertônicas. Visando estudar os efeitos destes osmólitos naturais sobre o músculo estriado esquelético, avaliamos os efeitos da betaína e do TMAO sobre a transmissão neuromuscular, a junção mioneural e sobre o AEC de músculo estriado esquelético.

A contração muscular é regulada por mudanças na conformação dos filamentos finos. Quando o músculo encontra-se relaxado, a tropomiosina oclui o sítio de ligação da miosina no filamento de actina, inibindo a actomiosina-ATPase (Cooke, 1997; Vibert *et al.*, 1997). A ativação da contração muscular depende da presença de íons cálcio no meio intracelular (Ashley *et al.*, 1991; Lamb & Stephenson, 1990; Brenner, 1986; Brenner, 1988). A despolarização do sarcolema e a consequente liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático (RS) levam ao aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático. O cálcio livre liga-se a sítios de baixa afinidade existentes na molécula da troponina C (TnC), resultando em modificações conformacionais do complexo troponina-tropomiosina (Guth & Potter, 1987; Brenner, 1986). A tropomiosina move-se desbloqueando o sítio e permitindo a interação cíclica das pontes transversas da miosina com a actina a qual resulta na produção de força pelo sistema contrátil, ou em seu encurtamento (Brenner, 1986; Vibert *et al.*, 1997). O relaxamento muscular é obtido graças a mecanismos de transporte ativo de íons cálcio do

citoplasma para o RS através da SERCA (bomba de Ca^{2+} /ATPase) presente na membrana longitudinal do RS (Bers *et al.*, 1990; Wolska & Lewartowski, 1993).

1.1. Acoplamento Excitação-Contração

O músculo esquelético é ativado por uma série de eventos altamente organizados que são coletivamente denominados **acoplamento excitação-contração** (Sperelakis,1998). Fisiologicamente, o AEC é o processo no qual a despolarização da membrana citoplasmática induz, pela ativação de sensores de voltagem do sarcolema, a liberação de íons cálcio de estoques do retículo sarcoplasmático (Brenner, 1991, Dirksen, 2002, Lacampagne *et al.*, 2000). Existem três processos que podem ser distinguidos no acoplamento excitação-contração: 1) sensibilização à voltagem, no túbulo-T; 2) transmissão do sinal e 3) liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Rios *et al.*,1992; Rios *et al.*, 1991).

As duas principais proteínas envolvidas neste processo de AEC são os receptores dihidropiridínicos (DHPRs) e os receptores rianodínicos (RyRs), sendo ambos canais de Ca^{2+} (Hamilton *et al.*, 2000). A proteína-receptor DHP está presente na membrana do túbulo-T do músculo esquelético e tem a função de sensor de voltagem do sarcolema e de canal de Ca^{2+} tipo-L (Dulhunty *et al.*,2002), enquanto os RyRs estão presentes na membrana do RS (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Assim, a abertura dos canais de cálcio presentes na cisterna terminal do RS (RyRs) e a consequente liberação de íons cálcio poderia ocorrer em consequência das alterações da voltagem ou do fluxo de corrente que seriam propagados a partir dos receptores dihidropiridínicos (Huang & Peachey, 1989; Ashley *et al.*, 1991; Rios *et al.*, 1991; Schneider, 1994; Felder *et al.*, 2002).

No músculo cardíaco, os potenciais de ação propagam-se pela superfície da membrana e ativam os canais sensíveis à voltagem (DHPRs) que rapidamente se abrem permitindo o influxo de Ca^{2+} extracelular para o citoplasma (Lamb, 2000). O Ca^{2+} no citoplasma liga-se aos receptores RyRs, na membrana do retículo sarcoplasmático, liberando Ca^{2+} do retículo e ativando mais canais RyRs, reforçando a liberação de Ca^{2+} para o citoplasma, processo conhecido por liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR) (Fabiato & Fabiato, 1978; Fabiato, 1981; Fabiato, 1992). O aumento da concentração de Ca^{2+} livre no citosol ativa o complexo troponina, desencadeando assim a contração do músculo cardíaco.

Apesar de ser mediado por proteínas homólogas, o acoplamento excitação-contração no músculo esquelético difere substancialmente do músculo cardíaco (Lamb, 2000).

1.1.1 AEC no Músculo Esquelético

No músculo esquelético, a ativação inicia-se quando um potencial de ação gerado no neurônio motor é propagado até os terminais axônicos, resultando na liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na fenda sináptica (Sperelakis, 1998). A ACh difunde-se em direção à membrana sarcoplasmática, e liga-se a sua molécula receptora. Esta molécula receptora é um canal iônico não seletivo, que quando ativado pela ACh permite o influxo de Na^+ e efluxo de K^+ levando a despolarização do sarcolema.

O potencial de ação propaga-se pelo interior da fibra por um sistema especializado de membranas tubulares chamados túbulos transversos ou túbulos T, estes são contínuos ao sarcolema e invaginam-se transversalmente para o interior da célula. As membranas dos túbulos T e o sarcolema são organizados para conduzir rapidamente o potencial de ação para toda a fibra muscular. Juntamente com as membranas do RS, o túbulo T forma uma junção especializada denominada tríade, que medeia a comunicação entre o

sarcolema (túbulo T) e a cisterna terminal do RS (Figura 1). Estas membranas estão separadas por uma fenda de ~15 nm (Radermacher *et al.*, 1994). Esta arquitetura entre as membranas permite que a transdução do sinal ocorra em 0.5 msec e o pico de Ca^{2+} citoplasmático ligando-se a TnC em torno de 2 a 3 msec (Tabela1) (Sperelakis,1998). Estes valores confirmam a sincronia da ativação do aparato contrátil e a rapidez da transdução do sinal devido às tríades juncionais.

TRÍADE JUNCIONAL

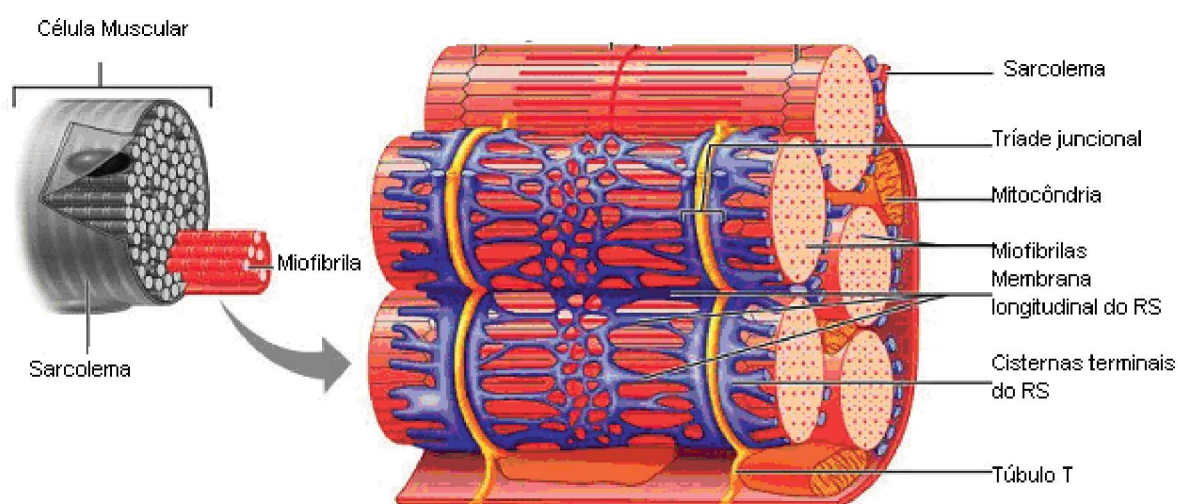


Figura 1. Célula de músculo estriado esquelético. À direita observamos as miofibrilas, o RS (em azul) juntamente com o Túbulo T (em amarelo) formando a tríade juncional, (Benjamin Cummings, 2004).

Na tríade, os receptores DHPRs detectam a despolarização da membrana e através de uma mudança conformacional em domínios intramembrana destes receptores ativam os canais de Ca^{2+} do RS (Huang & Peachey, 1989; Hamilton, 2000; Fill & Copello, 2002). O RS é uma organela altamente especializada no controle de Ca^{2+} citosólico. Além de liberação de Ca^{2+} para o citoplasma, o RS possui duas funções adicionais: recaptção de Ca^{2+} para iniciar o relaxamento muscular e armazenamento daquele para manter o relaxamento na fase quiescente. O citosol de uma fibra muscular em repouso contém $[Ca^{2+}]$ em torno de 0,1

μM , pela função da bomba $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ presente na membrana longitudinal do RS (SERCA) (Viires,1998). Após a liberação de Ca^{2+} no citosol, estes íons difundem-se e ligam-se a TnC ativando o aparato contrátil actina-miosina (Berchtold *et al.*,2000).

O AEC é finalizado quando a $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica retorna aos níveis de repouso, com sua recaptação pela SERCA, inibição do RyR e ligação do Ca^{2+} à calsequestrina (CSQ) (Sperelakis,1998). A CSQ é uma proteína de baixa afinidade para o Ca^{2+} . Este liga-se a essa proteína no lúmen do RS (Favero,1999). A sequência do AEC está mostrada esquematicamente na Figura 2.

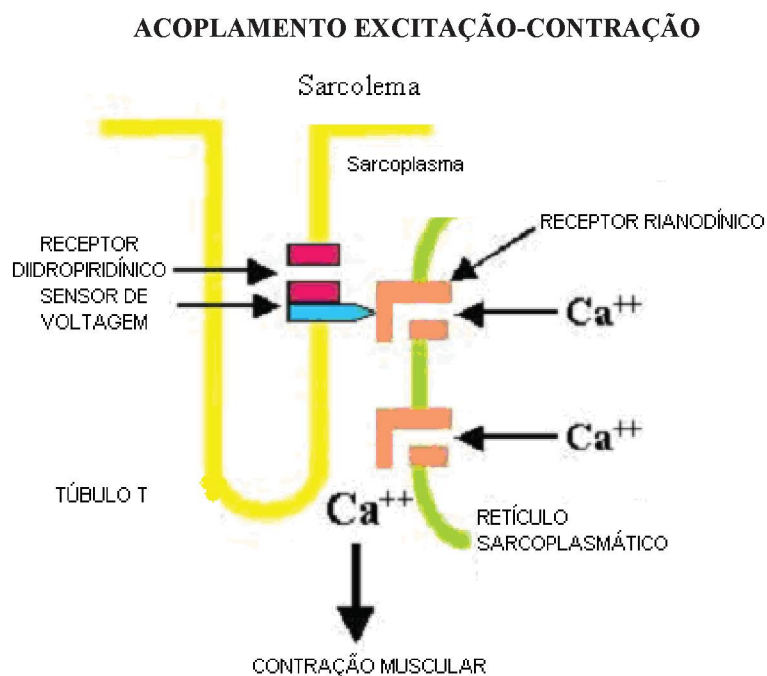


Figura 2. Sequência do acoplamento excitação-contracção no músculo esquelético:

- Transdução do sinal do DHP → RyR;
- Liberação de Ca^{2+} do RS;
- $\uparrow [\text{Ca}^{2+}]$ citosólico, (www.neuro.wustl.edu).

DURAÇÃO DAS FASES DO AEC EM MÚSCULO ESQUELÉTICO

Fases do AEC	Duração (msec)
Propagação do PA pelo sarcolema	5-10
Propagação do PA para o centro das fibras pelos Túbulos T	~0,7
Transdução de sinal na tríade, da despolarização Túbulo T à ativação do RyR	~0,5
Pico de liberação de Ca^{2+} ao pico de ligação Ca^{2+} /TnC (início da tensão)	2-3

Tabela 1. Duração das Fases do AEC no Músculo Esquelético. Duração das fases do AEC no músculo esquelético de sapo, fibra de 50 μ m em diâmetro e 5 cm de comprimento, (Sperelakis, 1998).

1.1.2. Bases moleculares do AEC

1.1.2.1. Sensores de voltagem do AEC

Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, também chamados de canais de Ca^{2+} tipo L, são complexos protéicos presentes em diversos tipos celulares, como células musculares e no tecido cerebral. Nas células musculares, estes são denominados receptores dihidropiridínicos por serem sensíveis às drogas do grupo das dihidropiridinas, como a nifedipina, que bloqueiam a abertura deste canal (Posterino & Lamb, 1998; Lamb, 2002). Estes receptores estão localizados no sarcolema e funcionalmente atuam como sensores de voltagem e canais de Ca^{2+} com corrente tipo L de longa duração (Chawla *et al.*, 2001). Porém no músculo esquelético, o influxo de Ca^{2+} via DHPR não ocorre como no músculo cardíaco (Hamilton, 2000), pois o receptor dependente de voltagem induz a abertura dos canais RyRs no sarcolema, pelos quais há a passagem de íons cálcio do RS para o citoplasma.

No músculo esquelético, a proteína DHPR é formada de quatro subunidades, α_1 (190-250 kDa), α_2 - δ (125 kDa), β (52-58 kDa), γ (25 kDa) (Hamilton, 2000; Dulhunty, 2002) (Figura 3).

RECEPTOR DHPR DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

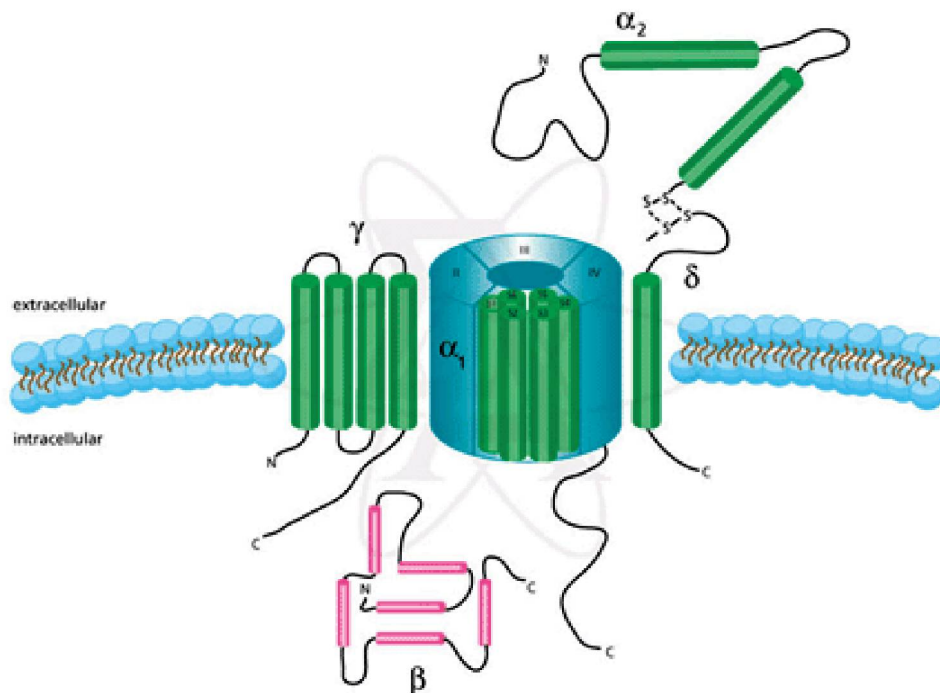


Figura 3. Receptor DHPR de músculo esquelético. Observa-se as subunidades transmembrana α e γ , a subunidade α - δ extracelular e a subunidade β intracelular, (Jones, 1998).

A subunidade α_1 é o componente funcional principal do canal. Ela é constituída de quatro domínios (I-IV), cada domínio composto por seis segmentos transmembrana (S1-S6) (Lamb *et al.*, 2000). Ela forma o poro do canal iônico, contém o sensor de voltagem no segmento S4 formado, principalmente, de cargas positivas com resíduos de arginina e lisina e possui o sítio de ligação para as dihidropiridinas (Kamp & Hell, 2000). A subunidade β tem o papel de direcionar o complexo protéico para a membrana do túbulo T (Dulhunty, 2002), e é responsável pela modulação do canal, possuindo sítios de alta e baixa afinidade com a subunidade α_1 (Garcia *et al.*, 2002), aumentando a corrente de cálcio por mecanismos desconhecidos (Garcia *et al.*, 2005). A subunidade α_2 - δ é formada por duas outras subunidades protéicas ligadas por uma ponte dissulfeto. A subunidade δ é uma proteína integral com segmento transmembrana único, seqüência protéica intracelular curta e seqüência protéica extracelular longa. A subunidade α_2 é uma proteína glicosilada

extracelular. Esta subunidade atua modificando as propriedades de “gating” do canal (Kamp & Hell, 2000). A subunidade γ é uma glicoproteína formada por quatro segmentos transmembrana (Jones, 1998). Estudos de voltage-clamp, em miotubos de ratos deficientes de subunidades γ , mostraram pequeno aumento na liberação de Ca^{2+} dependente de voltagem e nenhuma alteração na sensibilidade à voltagem, sendo necessário maiores investigações em relação à função da subunidade γ nos receptores DHPRs de músculo esquelético (Ursu *et al.*, 2001).

O receptor DHPR do músculo cardíaco apresenta diferentes isoformas. O complexo proteico é constituído de três subunidades, α_1 (240 kDa), α_2 - δ (125 kDa) e β (62 kDa), não possui a subunidade γ (Figura 4) (Hamilton, 2000). Estudos em receptores DHPRs cardíacos quiméricos contendo alças citoplasmáticas de DHPRs esqueléticos mostraram a produção de AEC característico de músculo esquelético, independentes de Ca^{2+} extracelular e com corrente tipo L (Tanabe *et al.*, 1990).

RECEPTOR DHPR DE MÚSCULO CARDÍACO

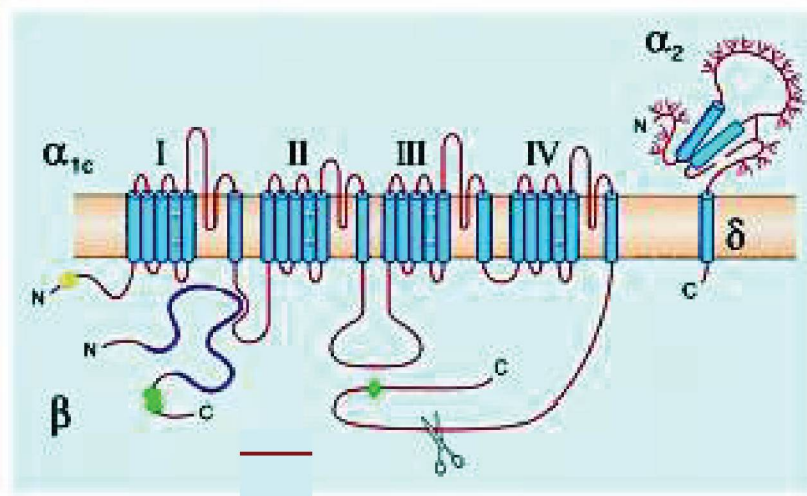


Figura 4. Receptor DHPR de músculo cardíaco. Observa-se a subunidades α , β e α - δ , (Kamp & Hell, 2000).

1.1.2.2. Canais liberadores de Ca²⁺ do RS

O RS contém canais especializados na liberação de íons cálcio. Eles integram duas famílias de canais: receptores IP₃ (IP₃Rs) e receptores rianodínicos. Cada família apresenta três diferentes isoformas e ambos apresentam conformação estrutural tetramérica (Fill & Copello, 2002).

Os receptores IP₃Rs necessitam da presença de trifosfato de inositol (IP₃) para serem ativados, e conduzem uma corrente de cálcio lenta, estando envolvidos na regulação da expressão gênica (Jaimovich & Carrasco, 2002).

O receptor RyR leva este nome devido a rianodina ligar-se a ele. A rianodina é um alcalóide neutro encontrado em plantas (Sutko *et al.*, 1997; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). A proteína RyR consiste em quatro subunidades idênticas, cada qual com massa ~560-kDa (Dulhunty *et al.*, 2002) (Figura 5).

RECEPTOR RIANODÍNICO

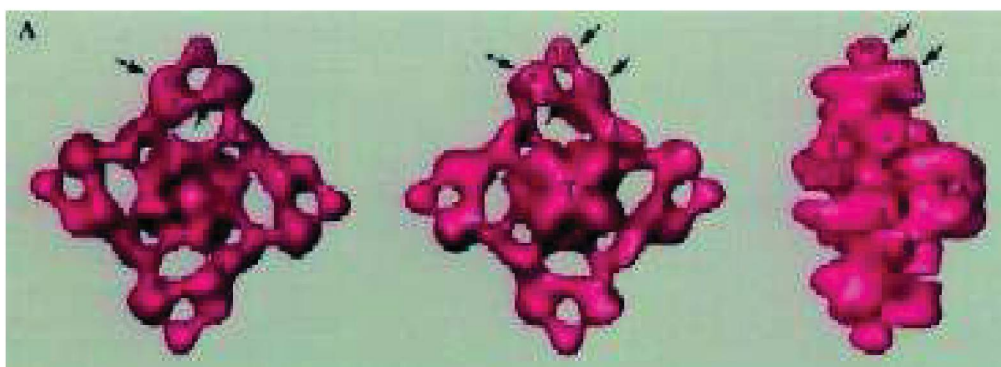


Figura 5. Receptor RyR, região citoplasmática, intra-organela e transmembrana respectivamente, (www.info.med.yale.edu).

Três diferentes genes que codificam receptores rianodínicos em mamíferos foram identificados, RyR1 (expresso principalmente em músculo esquelético), RyR2 (predominante em músculo cardíaco e cérebro) e RyR3 (expresso em músculo liso, cérebro e células não excitáveis como os linfócitos) (Priori & Napolitano, 2005; Dulhunty *et al.*, 2002;

Chawla *et al.*, 2001). Em células estriadas de não mamíferos existem duas isoformas identificadas, denominadas α e β , que apresentam homologia ao RyR1 e RyR3 respectivamente (Coronado *et al.*, 1994; Ogawa, 1994).

Os receptores RyRs fazem interações proteína-proteína com diferentes moléculas, FKBP12, calmodulina (CaM), calsequestrina, triadina, entre outras (Figura 6).

INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA NA MEMBRANA DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO

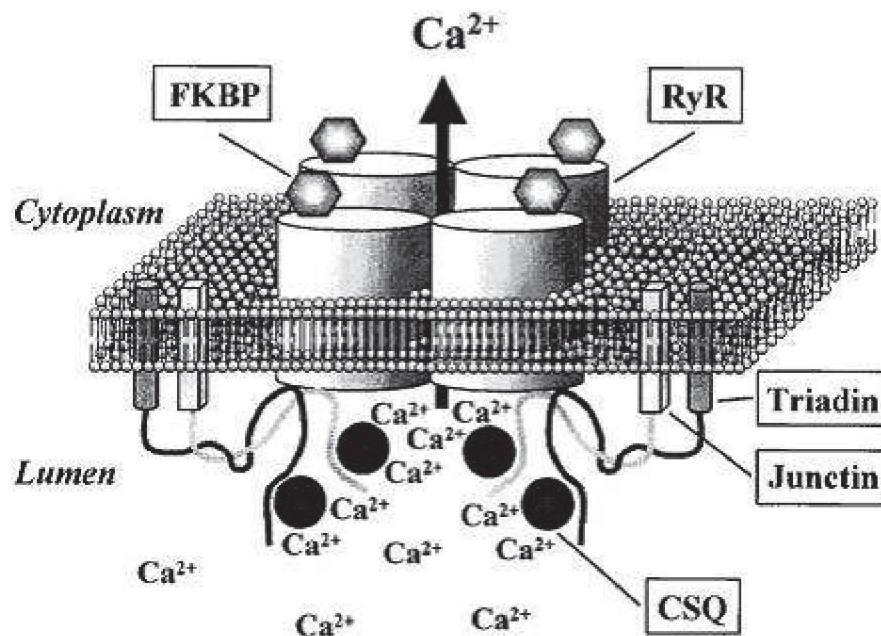


Figura 6. Esquema de interações proteína-proteína no RS relacionadas ao RyR. RyR, receptor rianodínico; FKBP, proteína ligante à FK506; CSQ, calsequestrina; Triadin, triadina; Junctin, junctina, (www.med.uc.edu/kranias/calsequestrin.html).

Cada monômero de RyR liga-se a uma molécula de FKBP12 em sítios específicos, situados na face citoplasmática da proteína canal (Avila *et al.*, 2003). A proteína FKBP12 é membro da família das imunofilinas, sendo receptores de drogas imunossupressoras como a FK506 e a rapamicina (Lamb & Stephenson, 1996). Estudos com FK506 e rapamicina demonstram o comprometimento da liberação de Ca^{2+} induzida pela despolarização devido à FKBP12 desligar-se do receptor RyR (Ahern *et al.*, 1994) alterando o acoplamento ortógrado (liberação de cálcio do RS por sensor de voltagem) (Avila *et al.*,

2003). A FKBP12 está, portanto, relacionada com a modulação do canal, sendo que sua função provavelmente é capacitar os sensores de voltagem a ativar os canais liberadores de cálcio (Lamb & Stephenson, 1996).

A calmodulina é uma proteína sensível ao cálcio freqüente no citoplasma que modula proteínas através da CaMK (calmodulina proteína quinase) ou ligando-se a própria proteína (Figura 7) (Yamaguchi *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2003). A proteína é composta por um domínio amino-terminal (NTD) e um domínio carboxi-terminal (CTD) conectadas por uma 8- α -helix, sendo que, cada domínio possui dois sítios de ligação sensíveis ao Ca^{2+} (Hamilton *et al.*, 2000). A CaM apresenta-se de duas formas: calmodulina livre de Ca^{2+} (apoCaM) e calmodulina ligada ao Ca^{2+} (Ca^{2+} CaM) (Hamilton, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2001). Em cada tetrâmero RyR1 se ligam quatro moléculas de CaM (O'Connell *et al.*, 2002). A CaM inibe as três isoformas de RyRs em concentrações micro a milimolares de Ca^{2+} livre (Yamaguchi *et al.*, 2003). Entretanto, os receptores RyR1 e RyR3 são ativados pela apoCaM quando a concentração de cálcio é menor que 1 μM (Yamaguchi *et al.*, 2001). Diferentes regiões estão relacionadas a modulação da CaM no RyR1 e RyR2, estudos com quimeras e mutações de múltiplos sítios de ambos os receptores estão sendo realizados a fim de evidenciar os domínios de ligação da calmodulina (Yamaguchi *et al.*, 2004).

CALMODULINA



Figura 7. Forma estrutural da calmodulina ligada a quatro íons cálcio (em verde) (Bernhard Rupp, 2000).

A calsequestrina é uma proteína que se liga ao Ca^{2+} intraluminal no RS (Figura 6). Ela permanece ancorada à membrana do RS por meio de uma glicoproteína, triadina, próxima aos canais liberadores de Ca^{2+} , na tríade juncional (Favero, 1999). A CSQ e o receptor rianodínico são funcionalmente acoplados, a ativação do RyR induz a dissociação do cálcio da CSQ, para que o cálcio livre possa ser liberado do RS (Coronado *et al.*, 1994). Esta interação é mediada por uma terceira proteína, a triadina.

A triadina é uma proteína transmembrana, localizada na tríade do músculo esquelético e cardíaco. Sua estrutura é formada de um pequeno domínio amino-terminal citoplasmático de 47 aminoácidos (1-46), seguido de único segmento transmembrana e longa região luminal (Groh *et al.*, 1999). A triadina associa-se ao RyR e à CSQ no lúmen do RS e está envolvida no acoplamento funcional entre ambos no lúmen (Figura 6) (Guo & Campbell, 1995). O domínio luminal é formado de aminoácidos carregados, alternados positiva e negativamente, sendo principalmente resíduos de lisina e ácido glutâmico. Estes motifs são chamados de “KEKE” (Kobayashi *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004). Dentro deste motif de 25 aminoácidos (201-224), os resíduos pares 210-224 da triadina formam uma estrutura β -folheada e se ligam aos resíduos carregados da CSQ, podendo ligar esta proteína à membrana juncional do RS (Kobayashi *et al.*, 2000). Na segunda alça intraluminal do RyR (região próxima ao poro do canal) encontram-se resíduos de ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu), que podem ser facilmente acessados pela triadina, segundo Lee e colaboradores, 2004, esta interação pode alterar propriedades dielétricas próxima ao poro, inibindo o canal liberador de cálcio (Figura 8).

INTERAÇÃO TRIADINA – RYR

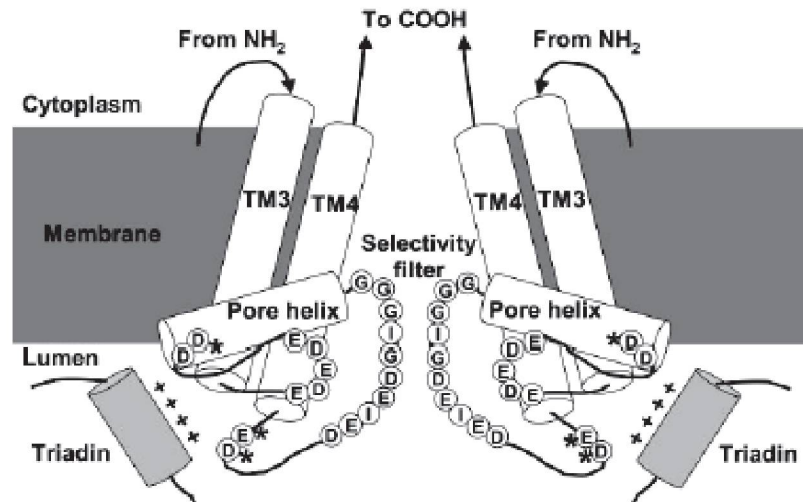


Figura 8. Interação entre triadina e RyR. A interação ocorre entre os resíduos de Asp (D) e Glu (E) e os resíduos carregados da triadina dentro do lúmen do RS (Lee *et al.*, 2004).

A junctina é uma proteína de 26-kDa que liga a calsequestrina à membrana juncional do RS juntamente com a triadina. Foi descrita primeiramente em músculo cardíaco de cães e posteriormente em músculo esquelético (Jones *et al.*, 1995). Possui uma pequena região amino-terminal voltada para o citoplasma, um segmento transmembrana e uma longa cauda carboxi-terminal, carregada positiva e negativamente alternadamente, na face luminal do RS, região esta que faz ligação com a CSQ (Jones *et al.*, 1995). Estudos recentes mostram que quatro elementos centrais estão envolvidos no mecanismo de transdução de sinal na membrana juncional do RS, o receptor RyR (canal liberador de Ca^{2+}), a CSQ (proteína que se liga ao Ca^{2+}), a triadina e a junctina (proteínas que estabilizam a CSQ na membrana juncional). Estas formam um complexo protéico quaternário necessário para que a liberação de íons cálcio ocorra adequadamente (Glover *et al.*, 2002).

1.1.2.3. Interação DHPR-RyR

No músculo esquelético, os receptores DHPR comunicam-se com os canais RyRs através de um processo físico proteína-proteína, no qual as membranas do túbulo-T e do retículo sarcoplasmático estão justapostas e os canais alinhados de maneira que para cada dois receptores RyR um não faz associação com DHPR e o outro está associado a uma tétrede DHPR e um pé juncional (Dulhunty *et al.*, 2002; Radermacher *et al.*, 1994) (Figura 9). Em estudos de microscopia eletrônica são vistos estes pés juncionais, que fazem a junção entre túbulo-T e retículo sarcoplasmático (Rios & Pizarro, 1991). Os pés juncionais são domínios citoplasmáticos do RyRs, que fazem conexão direta entre o canal liberador de Ca^{2+} e o DHPR presente no túbulo T (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997).

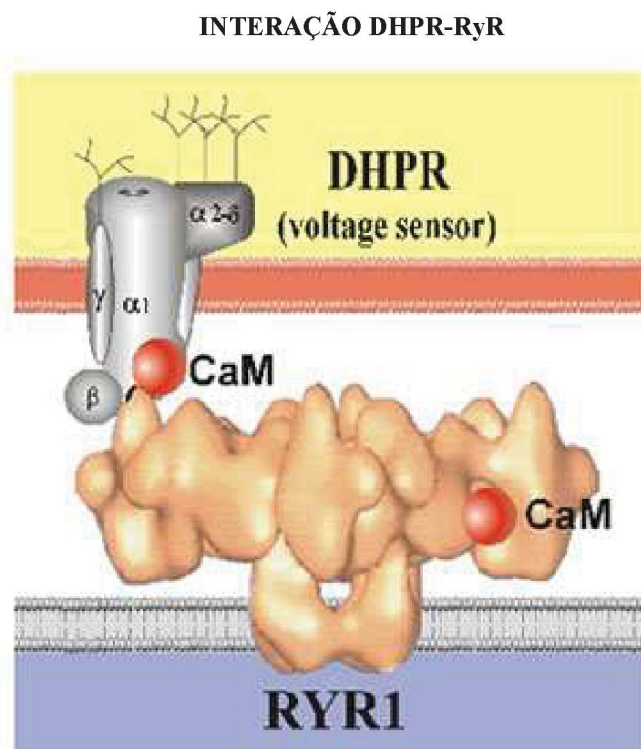


Figura 9. Interação DHPR e RyR1(www.bioscience.org).

Na ativação da contração do músculo estriado, tem-se como primeiro evento a despolarização da membrana do túbulo T. Esta é detectada pelos sensores de voltagem DHPRs, cuja atividade é iniciada na forma de movimento de carga (Rios *et al.*, 1992). No músculo esquelético, a corrente de íons cálcio através do receptor DHPR é lenta e de pequena magnitude, sendo que a ativação do RyR ocorre por uma ação direta do receptor DHPR sobre o canal liberador de Ca^{2+} do RS (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Embora o primeiro sinal no músculo esquelético aparentemente seja uma interação mecânica, a “liberação de cálcio induzido por cálcio” pode caracterizar a propagação do sinal de cálcio para ativação dos RyR1s que não estão emparelhados com os DHPRs (Hamilton *et al.*, 2000).

Estudos com microinjeções de cDNAs cardíacos e esqueléticos em miotubos disgênicos, que não expressavam a subunidades α_1 do receptor DHPR de músculo esquelético, indicaram que a região citoplasmática de alça II-III da subunidade α_1 do DHPR é responsável por mediar o AEC no músculo esquelético (Tanabe *et al.*, 1990; Stange *et al.*, 2001). Stange, 2001, mostra que a alça II-III da subunidade α_1 possui duas regiões específicas que ativam o canal RyR no RS, os resíduos 671-680 e 720-765, enquanto o resíduo 681-685, contendo 5 aminoácidos carregados positivamente, induzem a um estado de subcondutância do canal RyR. Portanto, o receptor RyR possui domínios exclusivos para ativar a liberação de cálcio do RS (Lamb *et al.*, 2001).

A atividade de liberação de íons cálcio do RS é controlada por uma variedade de interações protéicas e a interação entre os dois tipos de canais, DHPR no túbulo T e RyR na membrana do RS, é dominante no processo de acoplamento excitação-contração.

1.2. Efeitos da Hipertonicidade sobre o AEC de Músculo Estriado Esquelético

Vários autores mostraram os efeitos da hipertonicidade sobre as fibras musculares (Caputo, 1968; Gordon & Godt, 1970; Homsher, 1974; Somlyo *et al.*, 1977). Sabe-se que as soluções hipertônicas diminuem a força de contração do músculo esquelético, embora a excitabilidade da membrana seja minimamente afetada (Gordon & Godt, 1970; Lännergren & Noth, 1973; Vaughan *et al.*, 1983). Este efeito tem sido interpretado como consequência tanto de alterações estruturais das proteínas envolvidas no AEC (Caputo, 1966; Suarez-Kurtz & Sorenson, 1977b; Coutinho *et al.*, 1982; Sato & Fujino, 1987; Chawla *et al.*, 2001), como também por alterações na habilidade das proteínas contráteis em gerar força e promover encurtamento do sarcômero (Homsher *et al.*, 1974; Godt *et al.*, 1984; Piazzesi *et al.*, 1994).

O aumento da força iônica intracelular *per se*, a qual depende da quantidade de água intracelular perdida, provoca redução da tensão quando essas células são expostas a soluções hipertônicas (Vaughan *et al.*, 1983). As interações entre RyRs-DHPRs e outras proteínas são modificadas pelo aumento da força iônica produzido pelo aumento da tonicidade do meio extracelular (Chawla *et al.*, 2001). Dentre estas mudanças estruturais temos lesões no sarcolema, aumento no diâmetro de abertura do túbulo T, a fenda entre túbulo T e membrana do RS diminui (Chawla *et al.*, 2001) e ruptura da tríade juncional (Oota *et al.*, 1982). Alguns estudos tem mostrado que o músculo esquelético intacto polarizado possui atividade CICR em soluções hipertônicas na ausência de um bloqueador RyR (Chawla *et al.*, 2001; Huang, 1992). Esta atividade CICR pode ser resultante do desacoplamento entre RyR e DHPR e de alterações no “gating” do canal rianodínico.

Em seus estudos com fibras de músculo esquelético de anfíbio, Homsher, 1974, afirma que as alterações no processo de contração muscular devido à exposição a soluções

hipertônicas provavelmente ocorreram por um aumento na concentração de íon cálcio no sarcoplasma comprometendo as atividades ATPase miofibrilar e sarcotubular.

Mansson (1989), ressalta que a velocidade máxima de encurtamento e a tensão isométrica máxima são reduzidas em resposta ao aumento da tonicidade e estes efeitos são relacionados à diminuição do número de pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina. Em 1993, Mansson sugere que a distância entre as pontes cruzadas é reduzida diminuindo a produção de força.

Outro importante efeito encontrado é o aumento da tensão de repouso (Lännergren & Noth, 1973) de fibras musculares intactas quando a tonicidade da solução é aumentada. Estes autores sugeriram que quando a fibra é exposta à solução hipertônica, o efluxo de água em direção ao meio extracelular leva a um aumento da concentração de soluto no interior da célula e também a uma diminuição no espaço entre os filamentos de actina e miosina, o qual pode ser o início da interação entre os filamentos e geração de tensão. Chawla e colaboradores (2001), entretanto, sugeriram que este pequeno aumento da tensão resulte da liberação de cálcio dos estoques intracelulares devido a aumento da atividade CICR descrita anteriormente.

Estudos com o uso da técnica de crioultramicrotomia, mostraram que as soluções hipertônicas produzem: vacúolos frequentemente pareados adjacentes a linha Z, com concentrações de Na^+ e Cl^- ou S^{2+} maiores que as citoplasmáticas (Somlyo *et al.*, 1977).

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 (Godt *et al.*, 1993). Tais 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).

1.3. Osmólitos Naturais

Osmólitos orgânicos são solutos de baixo peso molecular acumulados por células de organismos que vivem sobre o estresse de água, como os invertebrados marinhos (Baskakov *et al.*, 1998; Yancey, 2005). Tal acúmulo tem a finalidade de balancear o aumento da osmolaridade extracelular protegendo dessa forma os processos celulares (Nakanishi *et al.*, 1990), protegendo as proteínas da desnaturação e perda de função (Baskakov *et al.*, 1998).

Estes osmólitos são geralmente categorizados em três grupos: aminoácidos (glicina, prolina, taurina, etc.) e seus derivados, carboidratos e metilaminas (óxido de trimetilamina, betaína e sarcosina) (Tseng & Graves, 1998). Aminoácidos e carboidratos são considerados “osmólitos compatíveis”, pois agem como estabilizadores protéicos, e mesmo em altas concentrações não afetam a função da proteína (Bowlus & Somero, 1979). Os eventos estressores contra os quais estes osmólitos agem incluem a desidratação, ambientes salinos e altas temperaturas (Yancey *et al.*, 1982).

As metilaminas são consideradas “osmólitos neutralizadores ou contra-atuantes” pois possuem a habilidade de proteger as proteínas intracelulares contra os efeitos deletérios da uréia (Yancey & Somero, 1979; Withers & Guppy, 1996; Burg & Peters, 1997). As principais metilaminas, como óxido de trimetilamina (TMAO), betaína e sarcosina possuem efeitos opostos aos da uréia sobre as propriedades cinéticas de várias enzimas (Yancey & Somero, 1979). Quando estes compostos, metilaminas e uréia, estão presentes em concentrações fisiológicas (proporção 1:2), seus efeitos se contrapõem equivalendo-se na maioria dos casos (Yancey & Somero, 1979; Ortiz-Costa *et al.*, 2002).

O fluido extracelular da maioria das espécies marinhas contém NaCl como o seu maior componente osmótico, sendo que o meio intracelular é composto por aproximadamente 50 % de solutos orgânicos, incluindo-se óxido de trimetilamina (TMAO) e

betáina (Bowlus & Somero, 1979). Lutz & Robertson (1971) pesquisando os osmólitos do coelacanto *Latimeria Chalumna* encontraram uma amostra significativa de uréia e TMAO no sangue e no músculo do animal. Geralmente em elasmobrânquios, o osmólito encontrado em altas concentrações intracelulares é o TMAO (Bedford *et al.*, 1998). Porém em células da medula renal de mamíferos, as quais possuem altas concentrações de uréia, o óxido de trimetilamina é ausente, portanto, para se adaptar a esta condição as células acumulam osmólitos como betáina, sorbitol, inositol e glicerofosforilcolina (Tseng & Graves, 1998; Bedford *et al.*, 1998). Burg & Peters (1997) analisaram os efeitos das metilaminas e uréia em células da medula renal de mamíferos e demonstraram que TMAO, betáina e glicerofosforilcolina não atuam contra os efeitos da uréia em todas enzimas intracelulares, mas que em algumas enzimas estas metilaminas atuam como agentes protetores dos efeitos da uréia. Estudos nos mostram que um osmólito pode agir estabilizando ou não uma enzima, dependendo de condições específicas, como a natureza do osmólito e a natureza da proteína. Além disso, dependendo da estrutura terciária e quaternária da proteína, um osmólito pode agir com maior ou menor intensidade como agente estabilizador ou desestabilizador (Meis & Inesi, 1988; Barton *et al.*, 1999; Saad-Nehme *et al.*, 2001; Ortiz-Costa *et al.*, 2002).

A betáina é um composto amônico quaternário, encontrado em microorganismos expostos a estresse de temperatura e/ou alta salinidade e plantas de áreas áridas e salinas (Holmström *et al.*, 2000). Também é denominada glicina betáina, licina, trimetilglicina, ou ainda, oxineurina (Craig, 2004). Esta é sintetizada a partir da colina pela ação da enzima colina dehidrogenase no córtex renal e no fígado (Nakanishi *et al.*, 1990; Holmström *et al.*, 2000). Possui a fórmula $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ e peso molecular igual a 117,2 (Withers *et al.*, 1994) e é caracterizada como metilamina devido aos 3 grupos metil (Yancey *et al.*, 1982). Sua principal função é proteger as células contra inativação por estresse osmótico.

Vários são os exemplos que demonstram a função de osmólito da betaína. As células da medula renal de mamíferos contêm alta concentração de betaína e outros osmólitos a fim de balancear a pressão osmótica das altas concentrações de NaCl extracelular encontrada nesta região renal (Nakanishi *et al.*, 1990). Em condições hiperosmóticas, a betaína regula o balanço hídrico e o movimento de água através do epitélio intestinal na porção duodenal (Kettunen *et al.*, 2001). Ela protege a atividade da miosina ATPase de músculo esquelético na presença de baixa concentração de uréia plasmática tão bem quanto previne mudanças estruturais na miosina em altas concentrações de uréia (Ortiz-Costa *et al.*, 2002). Alfieri (2002) demonstra que a betaína é capaz de adaptar as células endoteliais da artéria pulmonar à hipertonicidade e evitar a apoptose celular. Portanto, a adaptação osmótica ao estresse auxilia uma série de tipos celulares a manter sua função e integridade celular.

Estudos sugerem, portanto, que certos osmólitos teriam duplo papel: funcionar como osmólitos e ao mesmo tempo proteger estruturas celulares dos efeitos deletérios devido aumento da força iônica resultante da perda de água intracelular (Yancey & Somero, 1979; Yancey *et al.*, 1982; Zou *et al.*, 2002). Tem-se que os tipos de solutos e as proporções em que estes encontram-se nas células variam de acordo com o tecido e, além disso, as ações não-osmóticas de cada soluto ainda não estão bem esclarecidas (Miller *et al.*, 2000). Assim, em células musculares, as alterações na tonicidade do meio extracelular poderão afetar pelo menos e não exclusivamente dois processos: o acoplamento excitação-contração e a contratilidade propriamente dita. Estas alterações provocam modificações na capacidade de produção de força de células musculares que se refletirão na capacidade de adaptação e/ou sobrevivência de animais submetidos ao stress de água.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Esta pesquisa tem como objetivo geral avaliar os efeitos de osmólitos de ocorrência natural “betaína e TMAO” sobre a transmissão neuromuscular, sobre o AEC e sobre as proteínas contráteis de músculo estriado esquelético de mamíferos.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar os efeitos de soluções de tonicidades idênticas àquelas do líquido extracelular (ajustadas com diferentes osmólitos) em músculo esquelético de mamíferos, sobre a contratatura induzida por diferentes concentrações extracelulares de potássio, assim como, sobre a contração promovida pela cafeína;
- b) Investigar as conseqüências das alterações nos níveis de tonicidade da solução extracelular (ajustadas com betaína, 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 frênico);
- c) Investigar os efeitos de soluções de diferentes tonicidades (ajustadas com betaína, TMAO 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 sistema contrátil.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os equipamentos estão instalados no Laboratório de Fisiologia da Contração Muscular que conta com uma área física de aproximadamente 50 m², localizado no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

Equipamentos:

- 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;
- Polígrafos (Backmann e ECB);
- Computadores;
- Microscópio binocular;
- Estéreo microscópio;
- Transdutores de força isométrica (fabricado pela WPI).
- Sistema de câmaras móveis, construído em bloco de acrílico;
- Balança analítica;
- Potenciômetro para a determinação de pH das soluções empregadas;
- Registradores potenciométricos (para registro da força de contração muscular);
- Mesa com isolamento mecânico de vibrações constituintes diferentes filtros mecânicos;
- Geladeira e freezer.

3.1.1. Drogas e Reagentes

REAGENTES EMPREGADOS, FABRICANTE E LOTE

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 Erba	21398
Sarcosina	Sigma	117F-08444
TMAO	Sigma	092K3665

Quadro1. Drogas e reagentes.

3.2. Métodos

O estudo foi realizado com células musculares de mamíferos, utilizando-se ratos Wistar, machos, com peso corporal de aproximadamente 250-300 g. Os ratos foram fornecidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, e após terem sido anestesiados, com emprego de éter etílico - $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$, estes foram sacrificados. A seguir, os músculos diafragmas foram dissecados observando-se sempre conservação da junção neuromuscular de cada músculo. As preparações foram mantidas em solução nutritora de Tyrode (solução T), com a composição (em mM): NaCl 136; KCl 5; MgCl_2 0,98; CaCl_2 2; NaH_2PO_4 0,36; NaHCO_3 11,9; Glicose 5,5 e pH 7,4. O aumento da tonicidade da solução Tyrode foi realizado mediante a adição de sacarose (grupo controle) ou de betaína, sendo este o tratamento experimental. A seguir, para cada condição experimental realizaram-se:

3.2.1. Músculo intacto

Os músculos isolados juntamente com o nervo foram colocados em câmaras horizontais, contendo solução Tyrode e mantidos a uma temperatura ambiente (22-26 °C). As extremidades das fibras musculares do diafragma foram fixadas a um micromanipulador e a um transdutor de força em condições isométricas. Com o uso do micromanipulador, ajustou-se o músculo a um comprimento máximo (tensão na qual se obtém a maior produção de força). As respostas contráteis mecânicas foram registradas em polígrafo (Beckmann Recorder). Na solução contendo alta concentração de KCl este substituiu isosmoticamente o NaCl. As drogas (caféina, por exemplo) foram adicionadas diretamente à solução.

a) Contração muscular induzida por potássio:

Três contrações controles foram induzidas, através da imersão do músculo em soluções contendo 100 mM de potássio (KCl 100 mM). Nestas condições o músculo é despolarizado e produz uma contratura, que neste trabalho foi denominada como contratura potássica. A preparação, após ter encontrado seu estado estacionário de força, voltou a ser banhada com solução de Tyrode contendo 5 mM de K^+ (solução T). Em seguida, o feixe muscular foi submetido a soluções hipertônicas ajustadas com 100 mM de sacarose e despolarizadas com 100 mM de K^+ . Após nova contratura controle, as fibras foram novamente incubadas em solução hipertônica, desta vez ajustadas com 100 mM de betaína e despolarizadas com 100 mM de K^+ . Ao final, realizou-se mais uma contratura controle. Os dados foram normalizados para os valores de força gerada obtidos em solução de Tyrode contendo 100 mM de potássio (Quadro 2).

PROTOCOLO DE CONTRAÇÃO POTÁSSICA

1.º) Imersão da preparação em solução T e ajuste para o comprimento máximo;
2.º) Imersão da preparação em solução KCl 100 mM (contração) e retorno para solução T (relaxamento); repete 3 vezes;
3.º) Imersão da preparação em solução T + Sacarose 100 mM por 20';
4.º) Imersão da preparação em solução hipertônica com Sacarose + KCl 100 mM;
5.º) Imersão da preparação em solução T;
6.º) Imersão da preparação em solução T + Betaína 100 mM por 20';
7.º) Imersão da preparação em solução hipertônica com Betaína + KCl 100 mM;
8.º) Imersão da preparação em solução T.

Quadro 2. Roteiro do protocolo experimental em músculo intacto: contração muscular induzida por substituição isotônica do NaCl por KCl 100 mM.

b) Contração muscular induzida por cafeína:

Após três contraturas potássicas, as células foram submetidas à solução T contendo 3 mM de cafeína. A cafeína é uma substância capaz de liberar cálcio do retículo sarcoplasmático. No entanto, nesta concentração, é insuficiente para provocar a contração máxima. Isto nos permitiu observar a existência ou não de potencialização da contração cafeínica com a adição do osmólito. Após a preparação ter alcançado o estado estacionário da contração, foram adicionados à solução 100 mM de sacarose ou 100 mM de betaína (Quadro 3).

PROTOCOLO DE CONTRAÇÃO CAFEÍNICA

1.º) Imersão da preparação em solução T;
2.º) Imersão da preparação em solução KCl 100 mM (contração) e retorna para solução T (relaxamento); repete 3 vezes;
3.º) Imersão da preparação em solução T + cafeína 3 mM;
4.º) Imersão da preparação em solução T + cafeína 3 mM + Sacarose ou Betaína 100 mM.

Quadro 3. Roteiro de protocolo experimental em músculo intacto: contração muscular induzida por cafeína.

c) Contração muscular induzida por estímulo elétrico indireto:

Com o intuito de analisarmos os efeitos dos osmólitos naturais sobre a transmissão neuromuscular e junção mioneural, realizamos experimentos com estimulação elétrica indireta (EEI).

Feixes de células musculares foram submetidos à EEI, estimulando o nervo frênico. Inicialmente, foi realizada estimulação elétrica em feixes musculares imersos em solução T, sendo a amplitude desta contração considerada como controle em comparação com as seguintes. Neste protocolo aumentamos a tonicidade da solução de forma crescente, com 5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM de sacarose, betaína ou TMAO (Quadro 4). Em outra série de experimentos, a tonicidade do meio foi aumentada de forma abrupta pela adição de betaína ou

sacarose (300 mM) à solução (Quadro 5). O coto distal do nervo frênico foi estimulado com intensidade supralimiar, com pulsos quadrados de voltagem de duração de 1 mseg, a uma frequência constante de 0,5Hz .

PROTOCOLO DE CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EEI

1.º) Imersão da preparação em solução T e estimulação elétrica supralimiar do coto distal do nervo frênico;
2.º) Imersão da preparação em solução T + concentrações crescentes (5 a 300 mM) Sacarose + EEI;
3.º) Imersão da preparação em solução T 1h (fase de recuperação);
4.º) Imersão da fibra em solução T + concentrações crescentes (5 a 300 mM) Betaína ou TMAO + EEI;
5.º) Imersão da preparação em solução T 1h (fase de recuperação);
6.º) Imersão da fibra em solução T + EEI.

Quadro 4. Roteiro de protocolo experimental em músculo intacto: Contração muscular induzida por EEI.

PROTOCOLO DE CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EEI (EXPOSIÇÃO SÚBITA DE FIBRA MUSCULAR À 300 mM DE SOLUTO)

1.º) Imersão da preparação em T e estimulação elétrica do coto distal do nervo frênico;
2.º) Imersão da preparação em solução T + 300 mM Sacarose + EEI;
3.º) Imersão da preparação em solução T;
4.º) Imersão da preparação em solução T + 300 mM Betaína + EEI;
5.º) Imersão da preparação em solução T.

Quadro 5. Roteiro de protocolo experimental em músculo intacto: Fibras expostas subitamente à 300 mM de soluto e a contração muscular foi induzida por EEI.

d) Contração muscular induzida por estímulo elétrico direto:

Neste protocolo, as células musculares foram estimuladas eletricamente e a uma frequência constante. Todavia, a contração foi obtida de forma direta, ou seja, estimulando-se diretamente o músculo, assim poderíamos avaliar se os efeitos encontrados em EEI deviam-se à ação dos osmólitos sobre a placa motora. No protocolo empregado, da mesma forma que o anterior, após a obtenção da amplitude de contração controle, aumentamos a tonicidade da solução de forma crescente, com 5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM de sacarose, betaína ou TMAO. Nestas soluções, foi adicionado d-tubocurarina 60 µg (DTB),

para bloqueio de placa motora (Quadro 6). Em outra série de experimentos, a tonicidade do meio foi aumentada de forma abrupta pela adição de betaina ou sacarose à solução de forma a obter-se uma concentração destes solutos de 300 mM na presença de 60 µg (DTB) (Quadro 7).

PROTOCOLO DE CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EED

1.º) Imersão da preparação em solução T e estimulação direta das fibras musculares;
2.º) Imersão da preparação em solução T + concentrações crescentes (5 a 300 mM) Sacarose + 60 µg DTB + EED;
3.º) Imersão da preparação em solução T 1h (fase de recuperação);
4.º) Imersão da preparação em solução T + concentrações crescentes (5 a 300 mM) Betaína ou TMAO+ 60 µg DTB + EED;
5.º) Imersão da preparação em solução T 1h (fase de recuperação);
6.º) Imersão da preparação em solução T + EED.

Quadro 6. Roteiro de protocolo experimental em músculo intacto: Contração muscular induzida por EED.

PROTOCOLO DE CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EED (EXPOSIÇÃO SÚBITA Da FIBRA MUSCULAR À 300 mM DE SOLUTO)

1.º) Imersão da preparação em T e estimulação direta das fibras musculares;
2.º) Imersão da preparação em solução T + 300 mM Sacarose + 60 µg DTB + EED;
3.º) Imersão da preparação em solução T;
4.º) Imersão da preparação em solução T + 300 mM Betaína + 60 µg DTB + EED;
5.º) Imersão da preparação em solução T.

Quadro 7. Roteiro de protocolo experimental em músculo intacto: Fibras expostas subitamente à 300 mM de soluto e a contração muscular foi induzida por EED.

3.2.2. Fibra muscular desmembranada com o uso de saponina

Foram realizados experimentos em fibra desmembranada com saponina objetivando avaliar se os osmólitos naturais agiriam diretamente na liberação de íons cálcio no RS.

A técnica de fibra muscular desmembranada 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 (Godt *et al.*, 1991; Zhu & Nosek, 1992; Godt *et al.*, 1993; Lamb, 2002). Esta técnica apresenta a vantagem de se manter sob controle a composição química da solução que irá banhar o sistema tubular transverso, o retículo sarcoplasmático e o sistema contrátil.

Nestes experimentos, empregamos sobre os feixes musculares saponina 30 µg. A saponina é um glicosídeo, que acaba com a permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, pois, ao reagir com grupamentos de colesterol promove a formação de poros, os quais permitem a passagem de moléculas de alto peso molecular para o espaço miofilamentar. Contudo, a organização, a estrutura e a funcionalidade do sistema tubular transverso, retículo sarcoplasmático e do sistema contrátil são mantidos preservados.

Após a permeabilização da membrana, as células musculares eram transferidas para uma câmara contendo solução relaxante (R) – composição descrita na Tabela 2. As extremidades do feixe muscular eram fixadas a um transdutor de força (Scientific Instruments G.M.B.H, Heidelberg, República Federal da Alemanha) mantido em posição estacionária e a um micromanipulador, o qual permitia o ajuste de comprimento ideal do músculo. As contrações musculares eram registradas em um polígrafo. Um conjunto de câmaras construídas num bloco móvel de acrílico e contendo diferentes soluções, permitia que a fibra muscular fosse submetida a diferentes protocolos experimentais (Brenner, 1986; Fogaça *et al.*, 1997).

Após fixação da fibra muscular, a qual era realizada em solução R, a fibra era transferida para uma câmara contendo solução pCa 4,0 ($pCa = -\log [Ca^{2+}]$) objetivando avaliar a funcionalidade do sistema contrátil. Esta concentração de íons cálcio ($10^{-4}M$) é suficiente para ativar o sistema contrátil de forma máxima, sendo a contração induzida

registrada em polígrafo. Após a obtenção do estado estacionário de força ($F_{\text{máx}}$), a fibra foi transferida e mantida, durante 1 minuto, em uma câmara com solução R.

A seguir, a fibra foi transferida para uma câmara contendo solução R acrescida de 30 mM de cafeína, objetivando promover a depleção de íons cálcio do retículo sarcoplasmático.

Para que o RS fosse recarregado com íons cálcio, a fibra muscular era transferida para uma solução pCa 6,4 e alto EGTA (solução C). O tempo necessário para o recarregamento máximo do RS era de 2 minutos (Andrews *et al.*, 1991).

A seguir, a fibra muscular era transferida para uma câmara contendo solução pCa 8,5 e alto EGTA (solução L) por 30 segundos, objetivando a retirada de íons cálcio presentes entre as miofibrilas. Logo após, a preparação era transferida para uma câmara contendo solução L acrescida de 30 mM de cafeína e era mantida nesta solução por 30 segundos. Como nesta solução a capacidade de tamponamento dos íons cálcio é reduzida, isto permitia a ativação do sistema contrátil. A contração muscular assim obtida fornecia um índice apropriado da quantidade de cálcio liberada do RS.

Após a obtenção da contratura cafeínica (30 mM), a preparação era transferida para uma câmara contendo solução R por 1 min. e em seguida para a solução C permanecendo imersa nesta solução por 2 min.. Após relaxamento e recarregamento do RS, a fibra era imersa em solução L, na ausência e na presença de cafeína (3 mM) para a obtenção de uma contração submáxima (contração controle). Em alguns experimentos repetiu-se o procedimento anterior na presença de sacarose ou betaina (100 mM). Ao final do experimento, uma nova contratura cafeínica submáxima (3 mM) era realizada para verificar se o grau de contração era o mesmo do início do experimento (Quadro 8).

PROTOCOLO DE FIBRA DESMEMBRANADA COM USO DE SAPONINA

1.º) Dissecção – solução R (pCa 8,5 ↑EGTA);
2.º) Permeabilização – solução R + saponina (60 µg/ml), durante 40 min.;
3.º) Relaxamento – solução R, 1 min.;

4.º) Verificação do sistema contrátil – solução pCa 4,0 ↓EGTA, 1 min.;
5.º) Relaxamento – solução R, 1 min.;
6.º) Depleção de íons cálcio – solução R + cafeína (30 mM), 1 min.;
7.º) Recarregamento do RS – solução C (pCa 6,4 ↑EGTA), 2 min.;
8.º) Lavagem das miofibrilas – solução L (pCa 8,5 ↓EGTA), 30 seg.;
9.º) Liberação de cálcio do RS (contração muscular máxima) – solução L + cafeína (30 mM), 30 seg.;
10.º) Relaxamento – solução R, 1 min.;
11.º) Recarregamento do RS – solução C, 2 min.;
12.º) Liberação de cálcio do RS (contração muscular controle) – solução L + cafeína (3 mM), 30 seg.;
13.º) Relaxamento – solução R, 1 min.;
14.º) Recarregamento do RS – solução C, 2 min.;
15.º) Lavagem das miofibrilas – solução L + betaína ou sacarose (100 mM), 30 seg.;
16.º) Liberação de cálcio do RS (contração muscular) – solução L + betaína ou sacarose (100 mM) + cafeína (3 mM), 30 seg.;
17.º) Relaxamento – solução R, 1 min.;
18.º) Recarregamento do RS – solução C, 2 min.;
19.º) Liberação de cálcio do RS (contração muscular final) – solução L + cafeína (3 mM), 30 seg.;

Quadro 8. Roteiro de protocolo de fibra desmembranada com uso de saponina.

COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES EMPREGADAS EM EXPERIMENTOS COM FIBRA DESMEMBRANADA

	Solução R	Solução C	Solução L
Mg²⁺	1	1	0,1
MgATP	2	2	2
Fosfocreatina	15	15	15
EGTA	5	5	0,05
BES	50	50	50
pCa (-log[Ca²⁺])	8,5	6,4	8,5
Creatina kinase*	0,25	0,25	0,25
Força iônica**	200	200	200
PH	7	7	7

Tabela 2. As concentrações estão expressas em mM, exceto quando indicado.

* mg/ml

** A força iônica das soluções foi ajustada com metanosulfonato de potássio (KMSO₄).

Para se realizar o cálculo da composição das soluções empregadas em fibras quimicamente permeabilizadas foi utilizado um programa de computador em linguagem Turbo Pascal, o qual descreve as múltiplas constantes de equilíbrio de íons em solução usando constantes de associação previamente publicadas (Godt & Lindley, 1982; Andrews *et al.*, 1991).

3.3. Estatística

No presente estudo, para a análise dos dados e plotagem das figuras foi utilizado o programa Sigma Plot (fabricante: SYSTAT) e para a análise estatística utilizamos o programa estatístico Sigma Stat (fabricante: SYSTAT), o qual nos permitiu o emprego de diferentes testes, em conformidade com cada experimento. Em experimentos com contração muscular induzida por potássio foi empregado o teste estatístico Student Newman Keuls. Em experimentos de contração muscular induzida por cafeína e fibra desmembranada foi utilizado o teste-T pareado, enquanto que em experimentos com estimulações elétricas foi utilizado o teste estatístico de análise de variância (One Way Anova). Para a comparação de contrastes, foi utilizado a “posteriori” o teste de Tukey. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1. Efeito da betaína e sacarose na contração muscular induzida por potássio

Os registros originais da contração potássica em meio isotônico, bem como, na presença de betaína ou sacarose (100 mM) são mostrados na Figura 10. Os efeitos de soluções hipertônicas sobre as contrações induzidas por KCl 100 mM são mostrados na Figura 11. A contração potássica na presença de betaína ou sacarose foi, em relação ao controle (solução de Tyrode isotônica), respectivamente, de $358,90 \pm 32,18 \%$ (n=6) e $287,75 \pm 27,36 \%$ (n=6). Tanto a betaína quanto a sacarose potencializaram a força de contração induzida pelo KCl 100 mM em comparação com a força induzida pela contração em meio isotônico. Todavia, a força de contração induzida pela presença de betaína quando comparada aquela induzida na presença de sacarose não apresenta diferença estatística.

REGISTRO ORIGINAL DE UM EXPERIMENTO DE CONTRAÇÃO POTÁSSICA

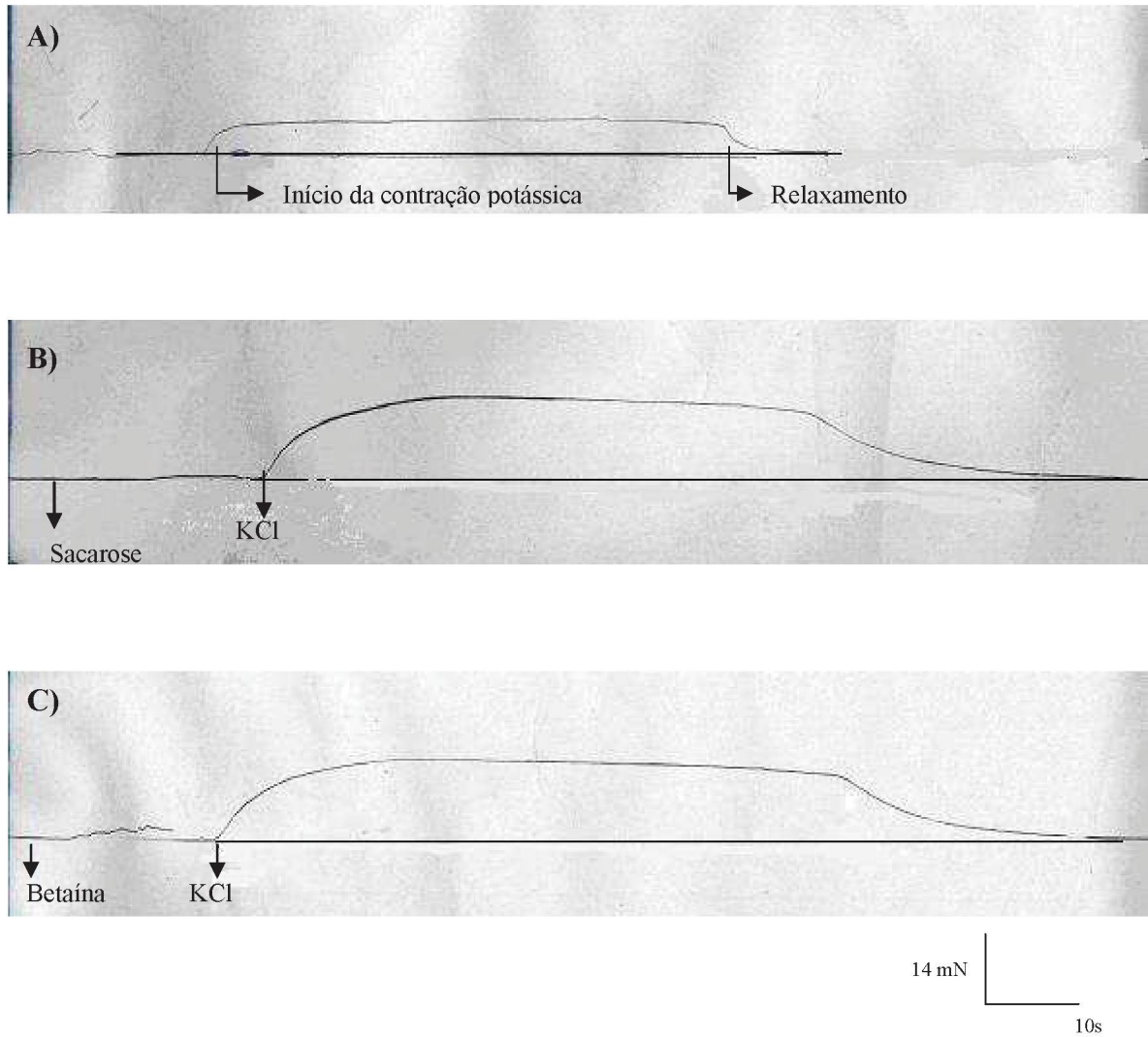


Figura 10. Registro original de experimento típico de variação de força no tempo. A) Registro original de um experimento de contração induzida por KCl 100 mM (seta início de contração potássica) em meio isotônico. B) Registro original de um experimento de contração potássica (seta KCl marca o início da contração induzida por KCl 100 mM) na presença de sacarose 100 mM. C) Registro original de um experimento de contração potássica na presença de betaina 100 mM. Em B e C observamos um aumento na força de contração quando comparados à força de contração registrada em meio isotônico (A).

**EFEITO DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS NA PRODUÇÃO DE FORÇA
MUSCULAR INDUZIDA POR SUBSTITUIÇÃO ISOTÔNICA DO NaCl POR KCl
(100 mM)**

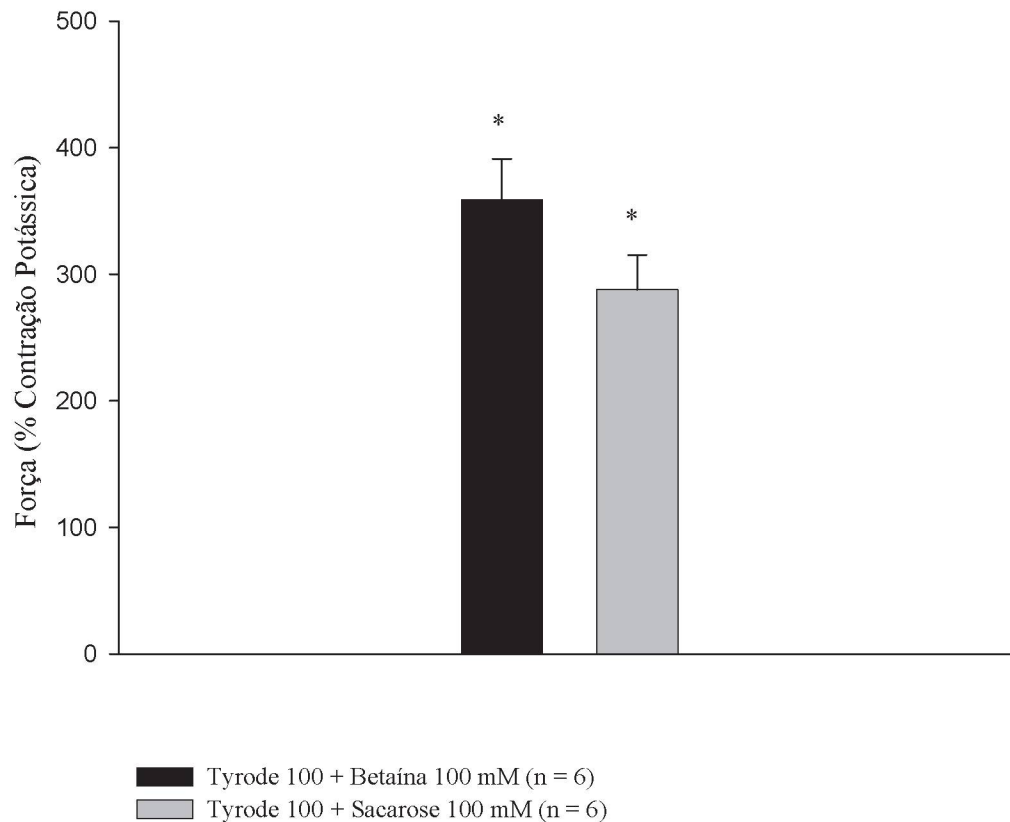


Figura 11. Representação gráfica dos dados de produção de força muscular induzida por substituição isotônica de NaCl por KCl (100 mM). Os dados estão expressos em valores percentuais e foram normalizados para a contração obtida em solução isotônica de Tyrode. * Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão, $p < 0,05$; teste Student Newman Keuls; sacarose e betaina 100mM vs controle.

4.2 Efeito da betaína e sacarose sobre a contração cafeínica

Os efeitos da betaína e da sacarose sobre a contração induzida por cafeína são mostrados na figura 12. Neste experimento, a baixa concentração de cafeína (3 mM) utilizada é suficiente apenas para a obtenção de uma contração submáxima. Isso nos permitiu observar a eventual potencialização ou não da contração cafeínica quando da adição dos osmólitos naturais. A produção de força induzida pela cafeína na presença de betaína ou sacarose (100 mM) foi, respectivamente, de $140,27 \pm 36,6 \%$ ($n = 6$) e $398,61 \pm 85,33 \%$ ($n = 6$) (Figura 13). Os resultados demonstram que tanto a betaína quanto a sacarose (100 mM) potencializaram a contração submáxima induzida pela cafeína (3 mM). Entretanto, a potencialização da contração na presença de sacarose foi bem maior (258,33%) do que na presença de betaína.

**REGISTRO ORIGINAL DE UM EXPERIMENTO DE PRODUÇÃO DE FORÇA MUSCULAR
INDUZIDA POR CAFEÍNA**

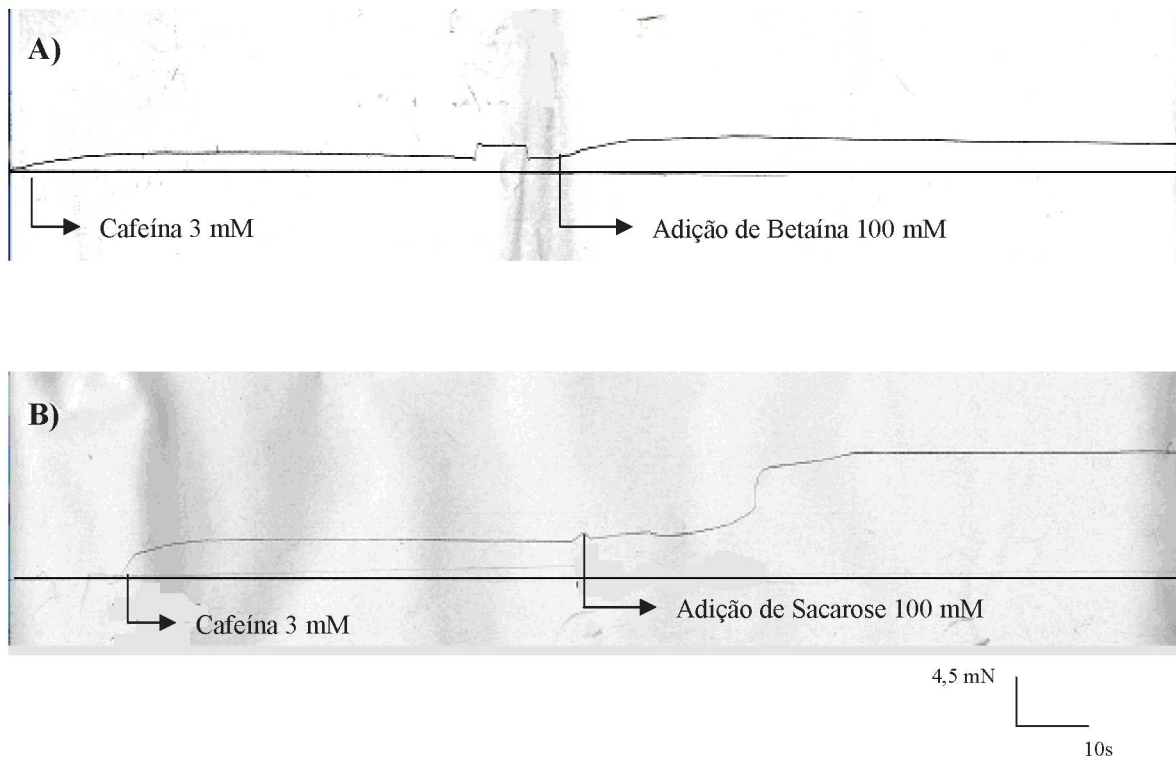


Figura 12. A) Registro original de um experimento de produção de força induzida por cafeína (3 mM) na ausência e na presença de betaína. B) Registro original de um experimento de produção de força induzida por cafeína (3 mM) na ausência e na presença de sacarose. Tanto em A quanto em B observamos a potencialização da contração submáxima induzida por cafeína na adição de betaína ou sacarose, respectivamente.

EFEITO DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS AJUSTADAS COM BETAÍNA OU SACAROSE NA CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA PELA CAFEÍNA (3mM)

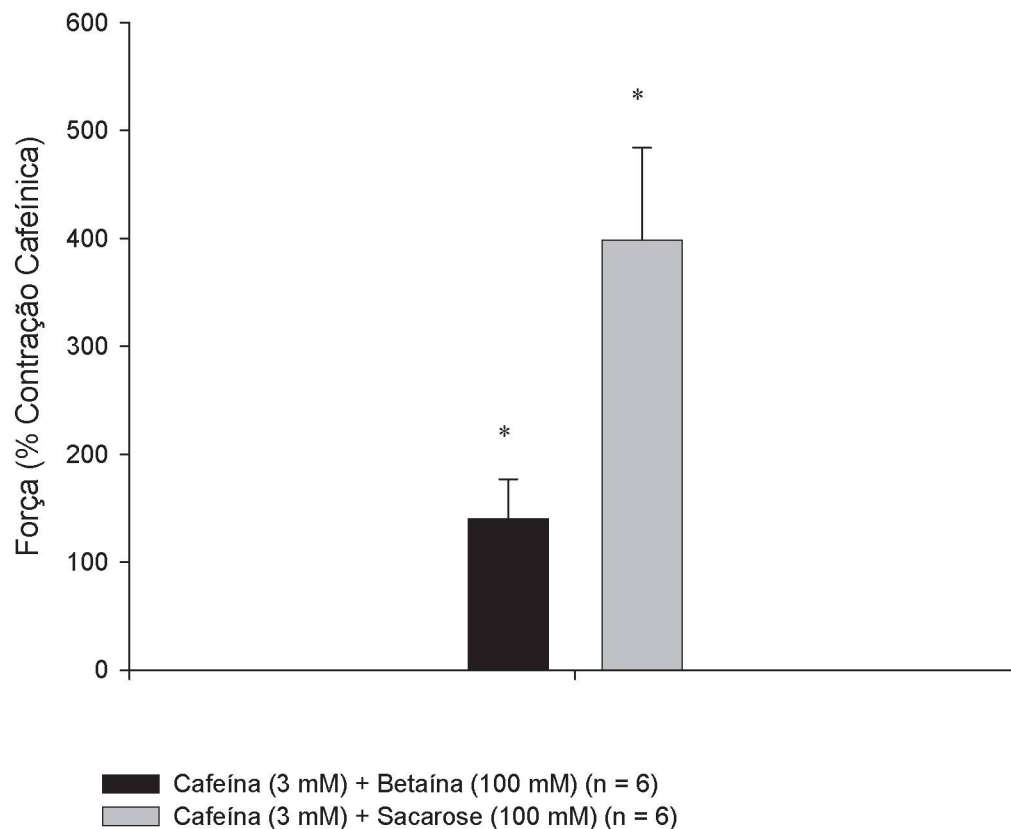


Figura 13. Representação gráfica dos dados de produção de força muscular induzida por cafeína (3 mM) na presença de betaína ou sacarose (100 mM). Os dados estão normalizados em valores percentuais àqueles obtidos com a cafeína (3 mM), e expressos na média \pm erro padrão. *A produção de força induzida por cafeína na presença de sacarose difere significativamente em relação ao controle e ao tratamento com betaína.

4.3. Efeito da betaína e da sacarose na produção de força muscular induzida por EEI

Os registros originais dos experimentos de contração muscular induzida por EEI são mostrados nas Figuras 14 e 15. Nestes experimentos adicionou-se sacarose ou betaína na solução T, em concentrações crescentes (5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM) (n = 6). Os resultados mostram que a força de contração muscular foi deprimida de forma concentração dependente tanto pela sacarose quanto pela betaína (Tabela 3). A concentração de betaína ou sacarose necessária para produzir a inibição de 50 % da força foi de aproximadamente 125 mM para ambos os compostos (Figura 16). Após o tratamento em solução hipertônica, a fibra muscular foi imersa em solução isotônica, na qual observou-se a recuperação da produção de força muscular em 72,37% em comparação à força controle inicial.

PRODUÇÃO DE FORÇA MUSCULAR INDUZIDA POR EEI

CONCENTRAÇÃO (mM)	BETAÍNA (média ± erro padrão)	SACAROSE (média ± erro padrão)
5	98,55 ± 9,41 %	97,23 ± 2,47 %
10	96,89 ± 9,89 %	85,24 ± 6,03 %
50	84,25 ± 6,69 %	76,44 ± 7,4 %
100	64,91 ± 9,36 %	64,96 ± 8,51 %
200	16,23 ± 8,89 %	19,03 ± 7,33 %
300	0,00	0,00

Tabela 3. Valores da produção de força muscular na presença de betaína ou sacarose nos experimentos de contração muscular induzida por EEI.

REGISTRO ORIGINAL DE UM EXPERIMENTO DE CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EEI EM SOLUÇÃO CONTENDO SACAROSE

A)

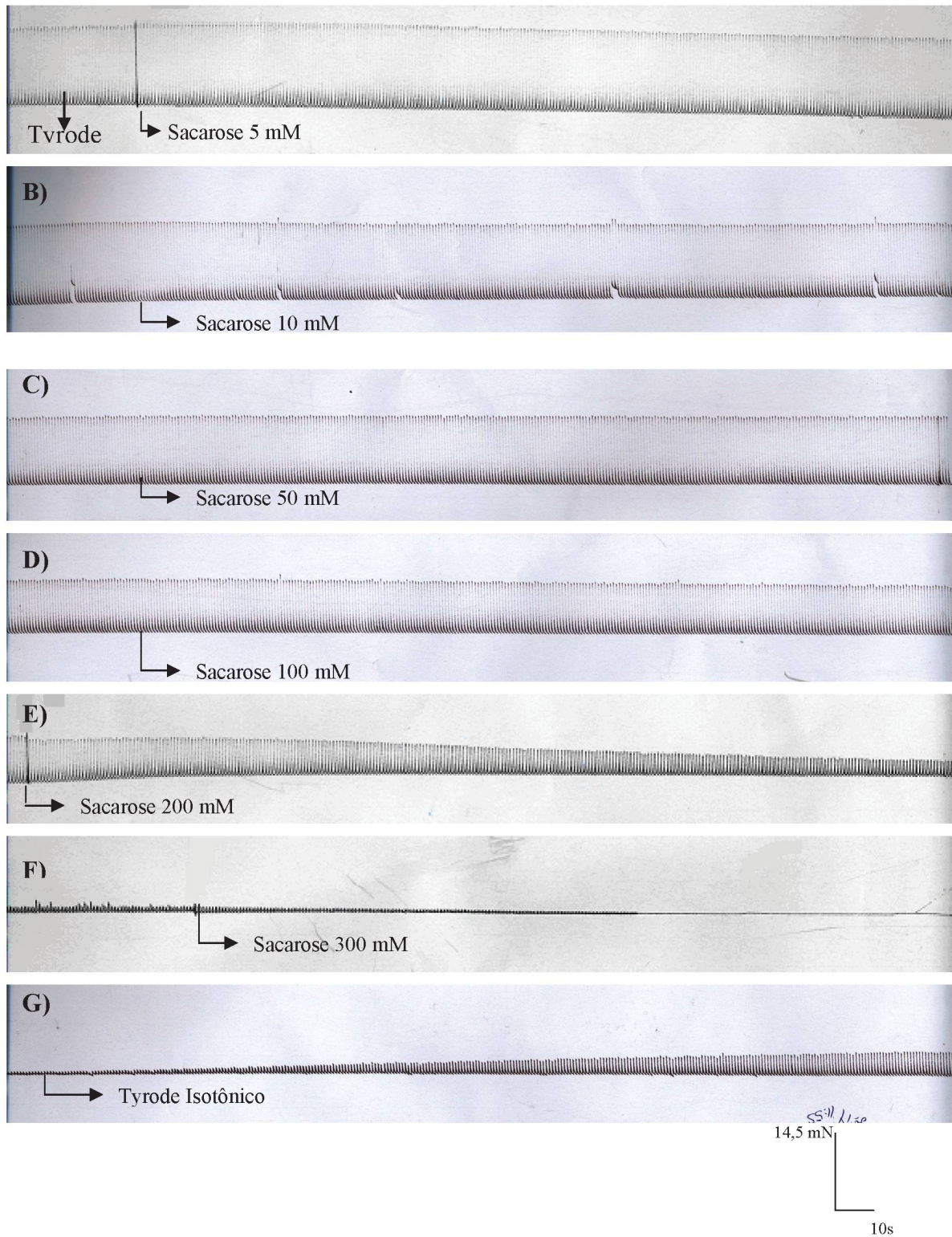


Figura 14. Registro original de experimento típico de produção de força muscular induzida por EEI em preparações contendo sacarose, em concentrações crescentes: A) sacarose 5 mM, não observa-se alteração no abalo; B) sacarose 10 mM; C) sacarose 50 mM; D) sacarose 100 mM; E) sacarose 200 mM e F) sacarose 300 mM. Em B, C, D, E e F houve diminuição da produção de força muscular de forma concentração-dependente. Em F, a fibra muscular foi imersa em solução isotônica após imersão em soluções hipertônicas, observa-se nesta fase a recuperação da produção de força muscular.

REGISTRO ORIGINAL DE EXPERIMENTO DE CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EEI EM SOLUÇÃO CONTENDO BETAÍNA

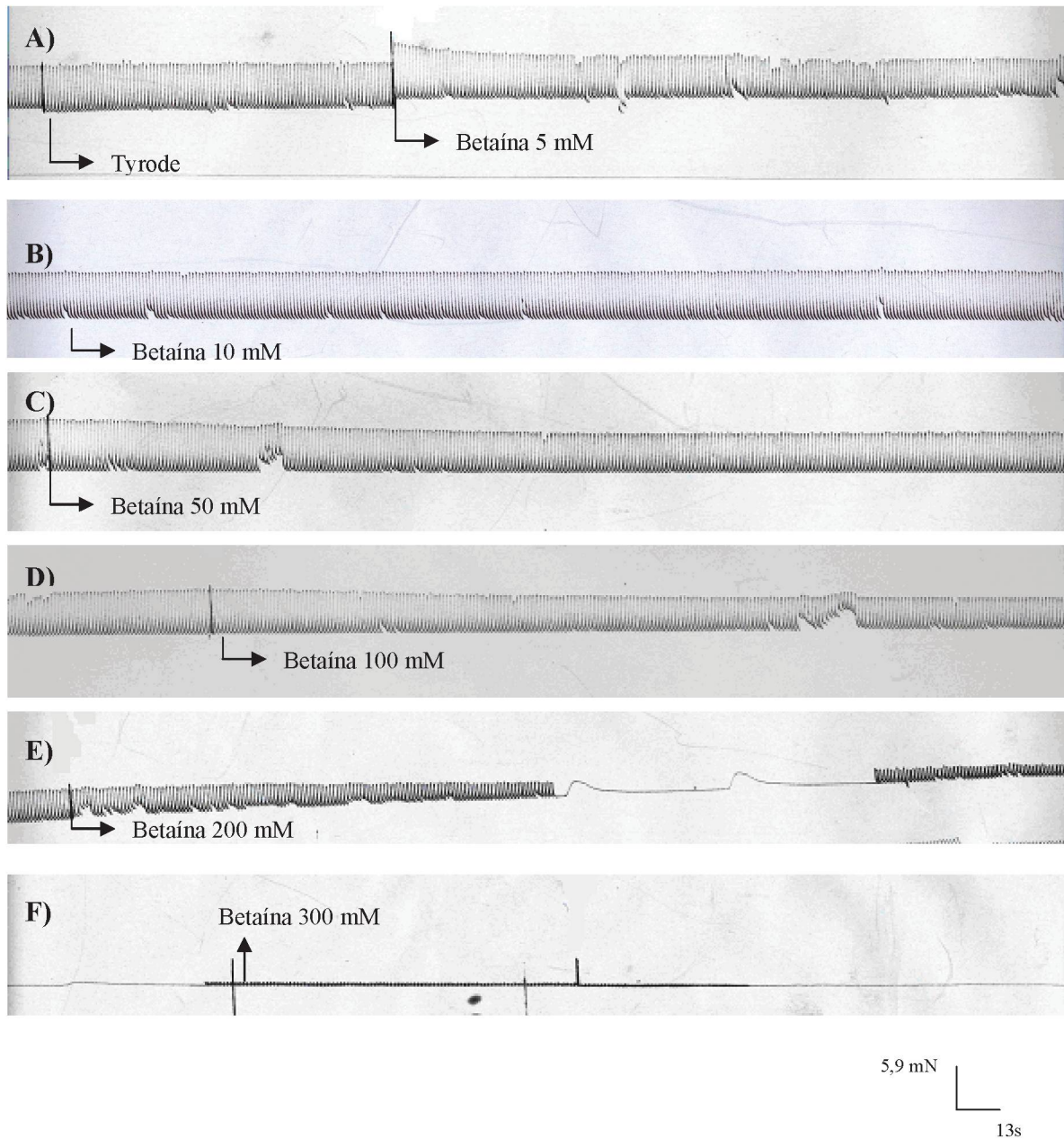


Figura 15. Registro original de experimento típico de contração muscular induzida por EEL em preparações contendo betaína, em concentrações crescentes: A) betaína 5 mM, sem alteração significativa no abalo; B) betaína 10 mM; C) betaína 50 mM; D) betaína 100 mM; E) betaína 200 mM e F) betaína 300 mM. Em B, C, D, E e F houve diminuição da produção de força muscular de maneira concentração-dependente.

EFEITO DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS AJUSTADAS COM BETAÍNA OU SACAROSE NA PRODUÇÃO DE FORÇA MUSCULAR INDUZIDA POR EEI

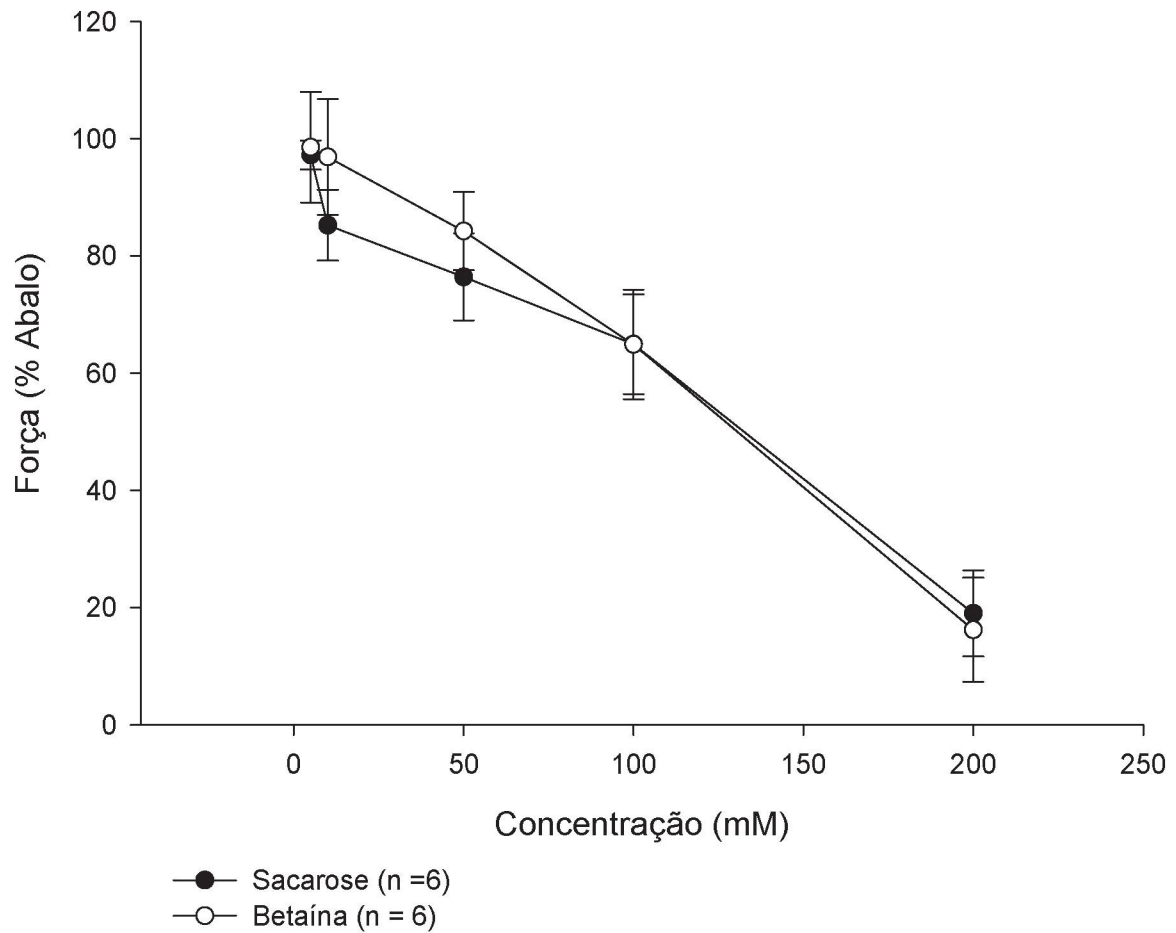


Figura16. Representação gráfica dos dados de produção de força gerada nas preparações de nervo frênico/músculo diafragma estimulados indiretamente. Os dados foram normalizados para a força muscular obtida em solução isotônica de Tyrode e estão expressos em valores percentuais como a média \pm erro padrão.

4.3.1. Efeito da exposição súbita de 300 mM de betaína ou sacarose na produção de força muscular induzida por EEI

Realizamos o mesmo protocolo anterior de contração induzida por EEI, adicionando-se diretamente à solução T 300 mM de betaína ou sacarose. Os registros originais deste experimento são mostrados na Figura 17.

Os níveis de força de contração obtidos na presença de 300 mM de betaína ou sacarose foram normalizados para os valores de contração muscular obtidos em solução isotônica de Tyrode. Foi observado aumento da contração basal (representado pelo levantamento da linha de base) nas contrações obtidas na presença de betaína ou sacarose de $35,41 \pm 7,51 \%$ e $31,69 \pm 26,03 \%$, respectivamente, em relação ao controle. A amplitude máxima da contração muscular (somatório da contração basal e abalo muscular), em ambas as soluções (betaína ou sacarose), foi reduzida a $44,64 \pm 13,87 \%$ e $47,05 \pm 24,01 \%$, respectivamente, em relação ao controle (Figura 18).

Comparando-se os valores de força de contrações musculares obtidas em solução contendo betaína ou sacarose (300 mM), não encontramos diferença significativa entre os tratamentos.

**REGISTROS ORIGINAIS DE EXPERIMENTOS DE PRODUÇÃO DE FORÇA MUSCULAR
INDUZIDA POR EEI NA EXPOSIÇÃO SÚBITA DE 300 mM DE BETAÍNA OU SACAROSE**

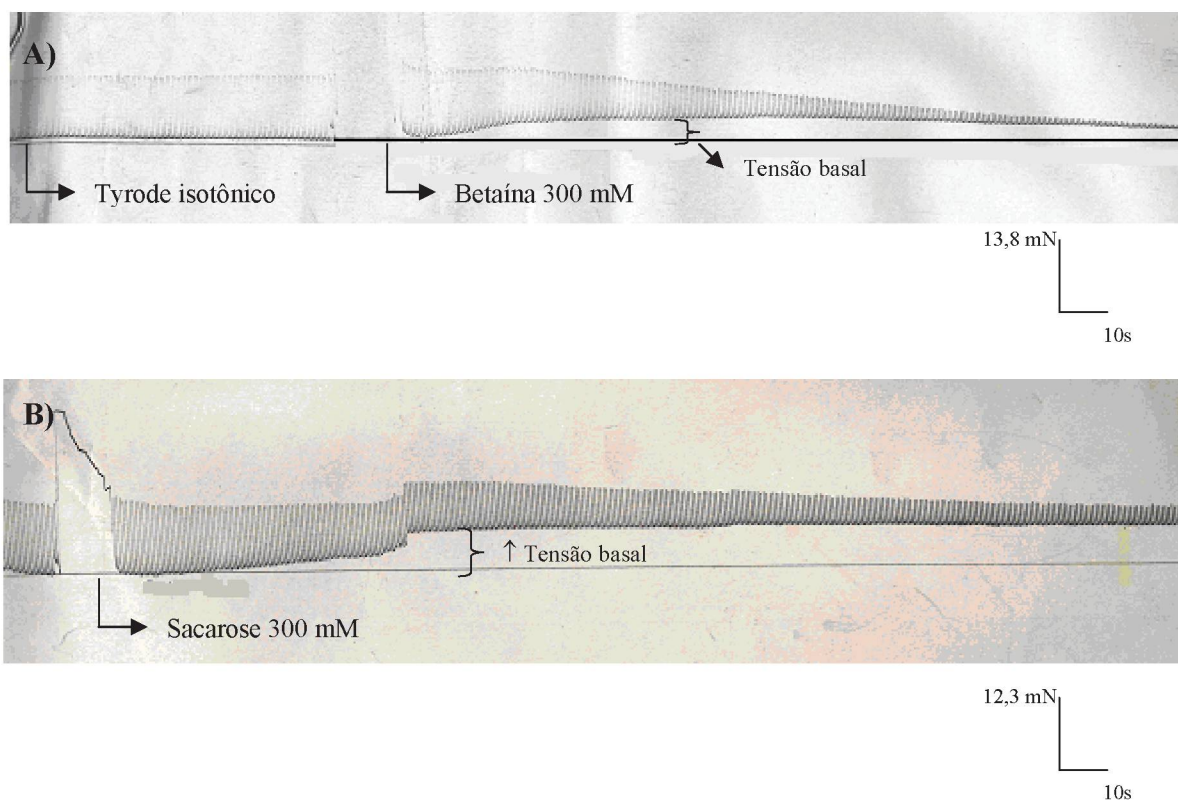


Figura 17. Registros originais de experimentos típicos de preparação de nervo frênico/diafragma estimulado indiretamente em solução isotônica e posteriormente na adição súbita de 300 mM de A) betaína e B) sacarose. Em ambos os experimentos observamos aumento da tensão basal.

EFEITO DA BETAÍNA E DA SACAROSE (300 mM) NA CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EEI

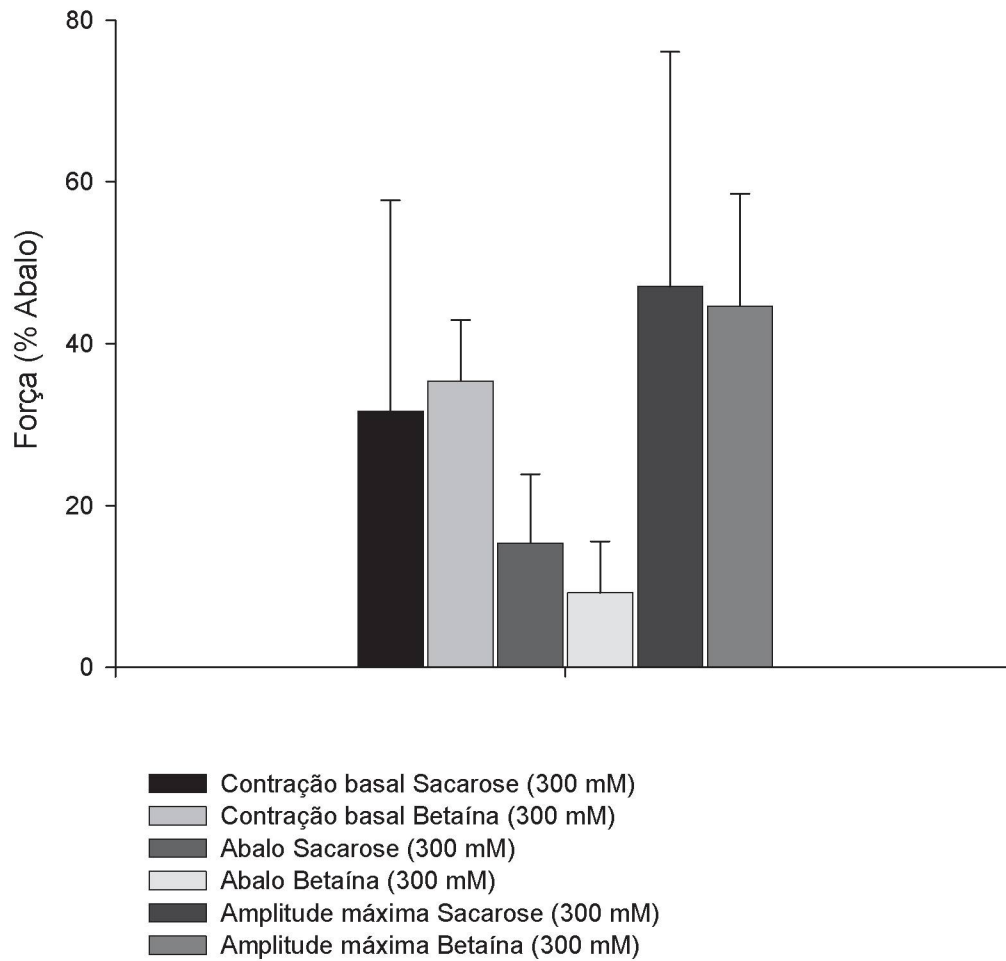


Figura 18. Representação gráfica do nível basal de força (contração basal), do abalo e da amplitude máxima (somatório da contração basal e abalo) de contração induzida por EEI, em músculo diafragma de rato expostos a soluções hipertônicas, ajustadas com Betaína ou Sacarose (300 mM). Os dados estão expressos em % de força em relação à contração controle obtida em solução T.

4.4. Efeito da betaína e da sacarose na produção de força muscular induzida por EED

Foram realizados experimentos de contrações musculares obtidas a partir da estimulação elétrica direta do músculo diafragma, em solução T. Nestes experimentos adicionou-se em solução T sacarose ou betaína, em concentrações crescentes (5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM) (n = 6) (Tabela 4). Nestes experimentos utilizamos d-tubocurarina (60 µg) para bloqueio de placa motora.

Os registros originais obtidos nestes experimentos são semelhantes aos obtidos quando do uso de EEI, assim sendo, os mesmos não são aqui apresentados. Os resultados mostram que a força de contração muscular foi deprimida de forma concentração dependente tanto pela sacarose quanto pela betaína (Figura 19). Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

PRODUÇÃO DE FORÇA MUSCULAR INDUZIDA POR EED

CONCENTRAÇÃO (mM)	BETAÍNA (média ± erro padrão)	SACAROSE (média ± erro padrão)
5	86,80 ± 7,23 %	89,77 ± 4,29 %
10	87,68 ± 7,98 %	84,98 ± 11,25 %
50	68,42 ± 16,10 %	75,69 ± 10,71 %
100	40,95 ± 22,46 %	51,43 ± 20,98 %
200	13,03 ± 7,52 %	11,00 ± 7,27 %
300	0,00	0,00

Tabela 4. Valores da produção de força muscular na presença de betaína ou sacarose nos experimentos de contração muscular induzida por EED.

EFEITO DA BETAÍNA E DA SACAROSE NA PRODUÇÃO DE FORÇA MUSCULAR INDUZIDA POR EED

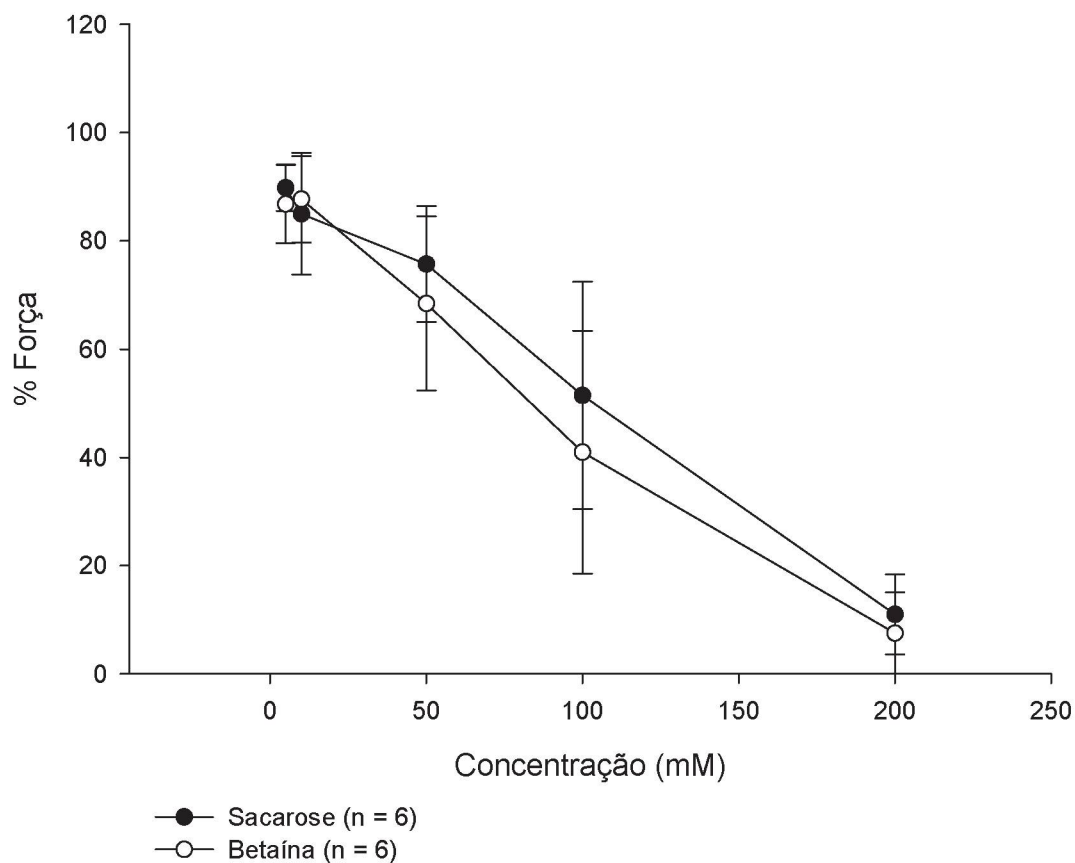


Figura 19. Representação gráfica dos dados de produção de força gerada pelo músculo diafragma de rato estimulado diretamente em solução contendo betaína ou sacarose. Os dados foram normalizados para os valores de força obtidos em solução T e estão expressos em valores percentuais como a média \pm erro padrão. Não houve diferença entre os tratamentos, em ambos a produção de força muscular diminui de forma concentração-dependente.

4.4.1. Efeito da exposição súbita de 300 mM de betaína ou sacarose na produção de força muscular induzida por EED

Os registros originais mostram discreto aumento da contração basal, tanto para betaína quanto para sacarose, os quais se mantêm durante todo o tratamento com betaína ou sacarose. Todavia, a amplitude máxima de contração foi deprimida de forma tempo-dependente (Figura 20).

As fibras musculares expostas à sacarose desenvolveram aumento da contração basal, que atingiu $77,52 \pm 29$ % do valor de força controle. Em solução contendo betaína, o aumento da contração basal obtido foi de aproximadamente $36,16 \pm 12,23$ %. A amplitude máxima de contração muscular obtida em solução contendo betaína ou sacarose foi respectivamente de $40,19 \pm 5,09$ % e $86,19 \pm 29,98$ %. Não há diferença significativa entre os tratamentos. Os efeitos do tratamento com solução contendo betaína ou sacarose (300 mM) na produção de força induzida por EED são mostrados na Figura 21 (n = 4).

**REGISTROS ORIGINAIS DE EXPERIMENTOS DE PRODUÇÃO DE FORÇA MUSCULAR
INDUZIDA POR EED NA EXPOSIÇÃO SÚBITA DE 300 mM DE BETAÍNA OU SACAROSE**

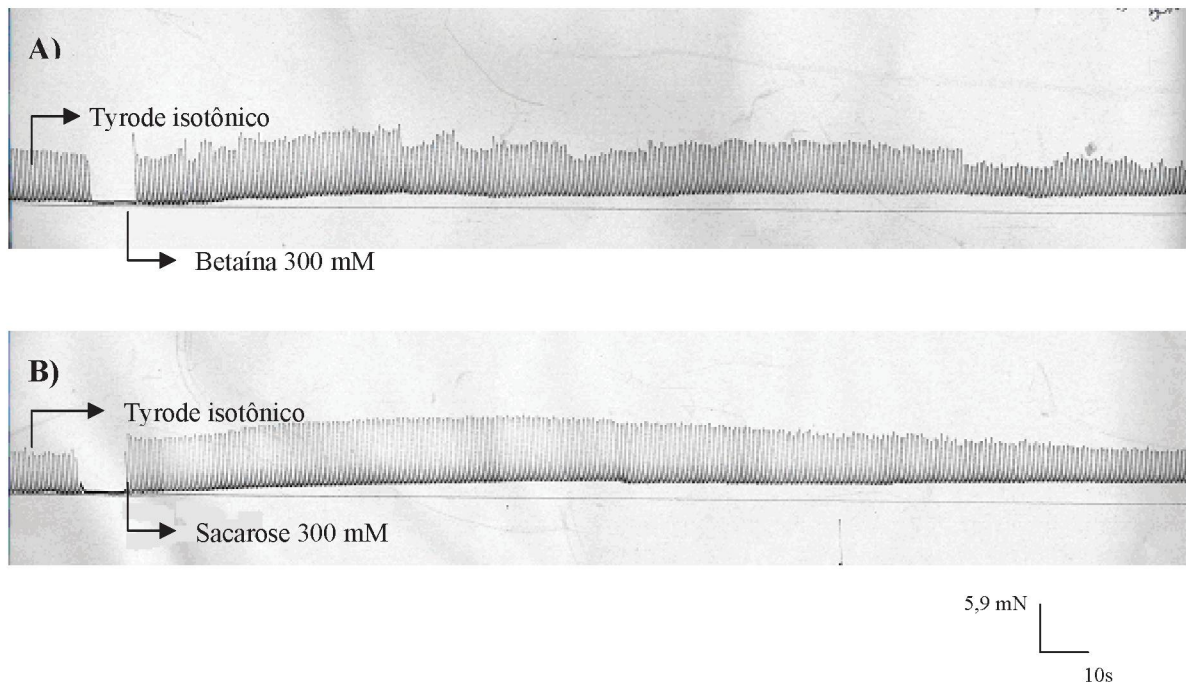


Figura 20. Registros originais de experimentos típicos de contração muscular estimulada diretamente em solução isotônica e posteriormente na adição súbita de 300 mM de A) betaína e B) sacarose. Em ambos os experimentos observamos aumento da tensão basal.

EFEITO DA BETAÍNA E DA SACAROSE (300 mM) NA PRODUÇÃO DE FORÇA MUSCULAR INDUZIDA POR EED

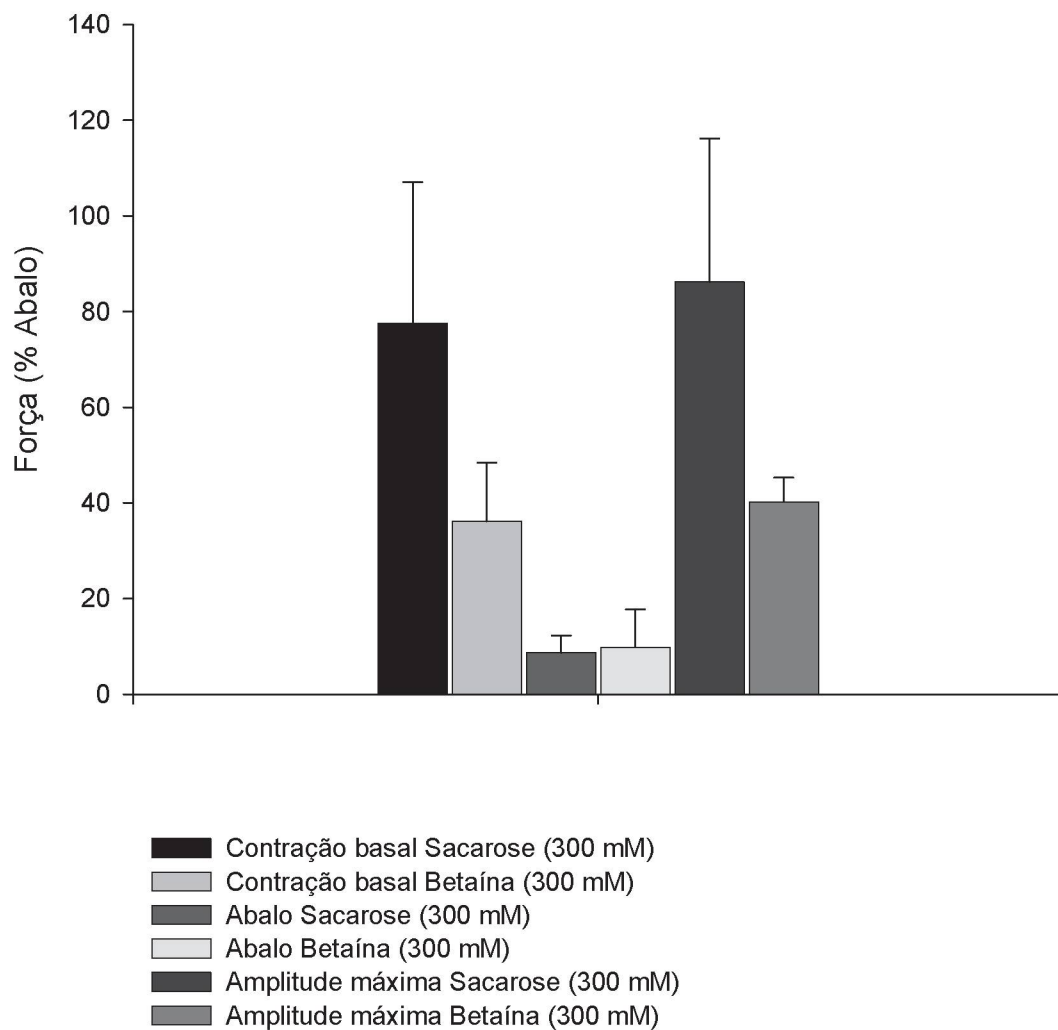


Figura 21. Representação gráfica do nível basal de força (contração basal), do abalo e da amplitude máxima (somatório da contração basal e abalo) de contração induzida por EED, em músculo diafragma de rato expostos a soluções hipertônicas, ajustadas com Betaína ou Sacarose (300 mM). Os dados estão expressos em % de força em relação à contração controle obtida em solução T.

4.5. Efeito do TMAO na produção de força muscular induzida por EEI

Foram realizados experimentos com diferentes concentrações de TMAO com o objetivo de comparar seus efeitos com os da betaína, já que em experimentos anteriormente realizados em nosso laboratório com TMAO, em músculo estriado esquelético de anfíbio, demonstrou-se que este composto produziu a potencialização da contração induzida pela cafeína.

Realizamos o mesmo protocolo descrito no item 4.3, com concentrações crescentes de TMAO (5, 10, 50, 100, 200, 300 mM) (n = 4) (Figura 22). Em relação aos dois parâmetros avaliados, contração basal (representado nos registros originais pelo levantamento da linha de base) (Figura 23) e abalo (força máxima obtida por estimulação elétrica), verificou-se que o TMAO e a sacarose reduziram, de forma concentração dependente o segundo parâmetro. A concentração tanto de TMAO quanto de sacarose, necessárias para produzir 50 % de inibição do abalo foram idênticas, ou seja, de aproximadamente 150 mM (Figura 24). Em relação à contração basal, verificou-se que o TMAO, mas não a sacarose, promoveu aumento nesse parâmetro, efeito este que não mostrou ser dependente das concentrações empregadas. O aumento na contração basal obtido com 5 mM de TMAO foi praticamente idêntico ao obtido com 300 mM deste osmólito. O somatório entre contração basal e abalo é igual a amplitude máxima de força. Em experimentos com TMAO, houve um aumento da amplitude máxima, observado na Figura 25.

**REGISTROS ORIGINAIS DE EXPERIMENTOS DE CONTRAÇÕES MUSCULARES INDUZIDAS
POR EEI EM SOLUÇÕES CONTENDO TMAO OU SACAROSE**

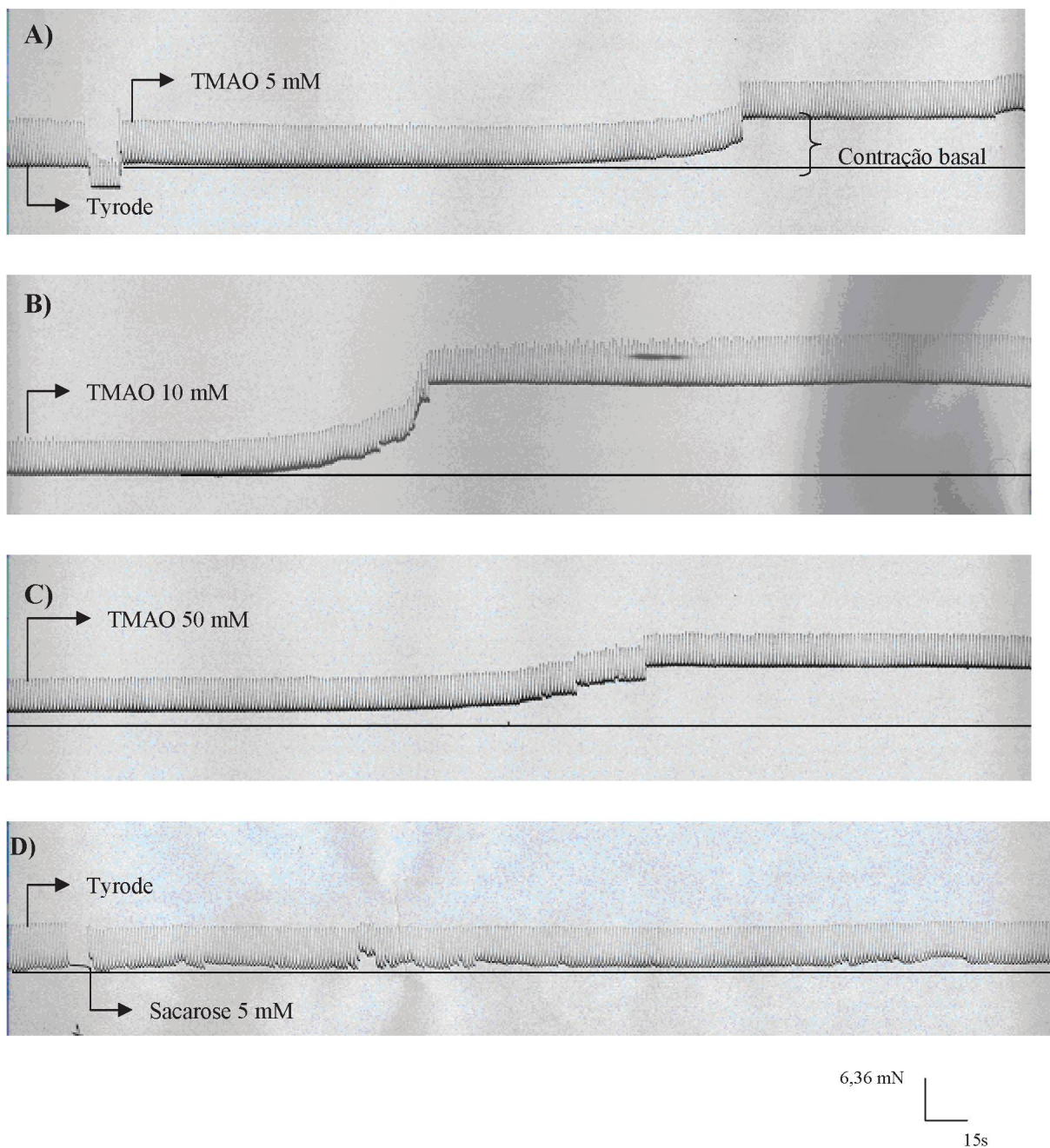


Figura 22. Registros originais de um experimento típico de contração muscular induzida por EEI em soluções contendo concentrações crescentes de TMAO: A) TMAO 5 mM; B) TMAO 10 mM; C) TMAO 50 mM; D) Sacarose 5 mM. Em A, B e C houve aumento na contração basal, o mesmo não é observado em D.

EFEITO DO TMAO E DA SACAROSE NA CONTRAÇÃO BASAL DE EXPERIMENTO DE CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EEI

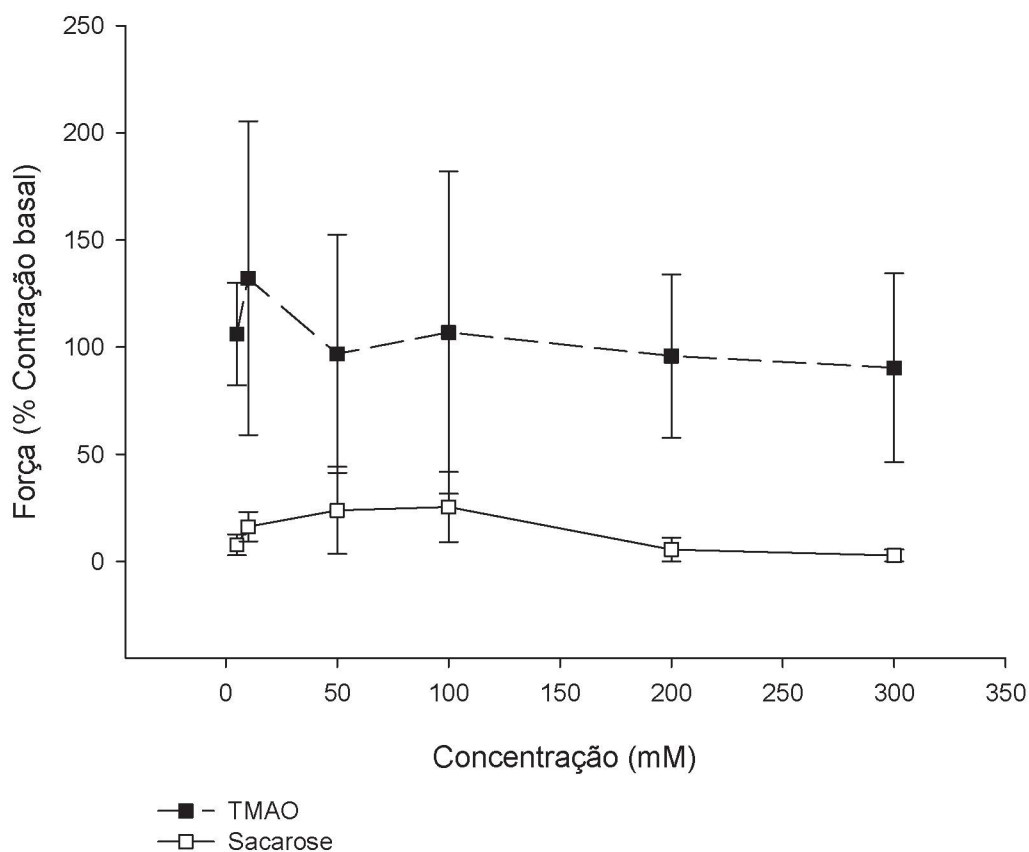


Figura 23. Representação gráfica dos dados de produção de força basal induzida por EEI, em músculo diafragma de rato exposto a soluções hipertônicas, ajustadas com TMAO ou sacarose. Os dados foram normalizados para as contrações obtidas em solução isotônica de Tyrode.

**EFEITO DO TMAO E DA SACAROSE NO ABALO MUSCULAR INDUZIDO POR
EEI**

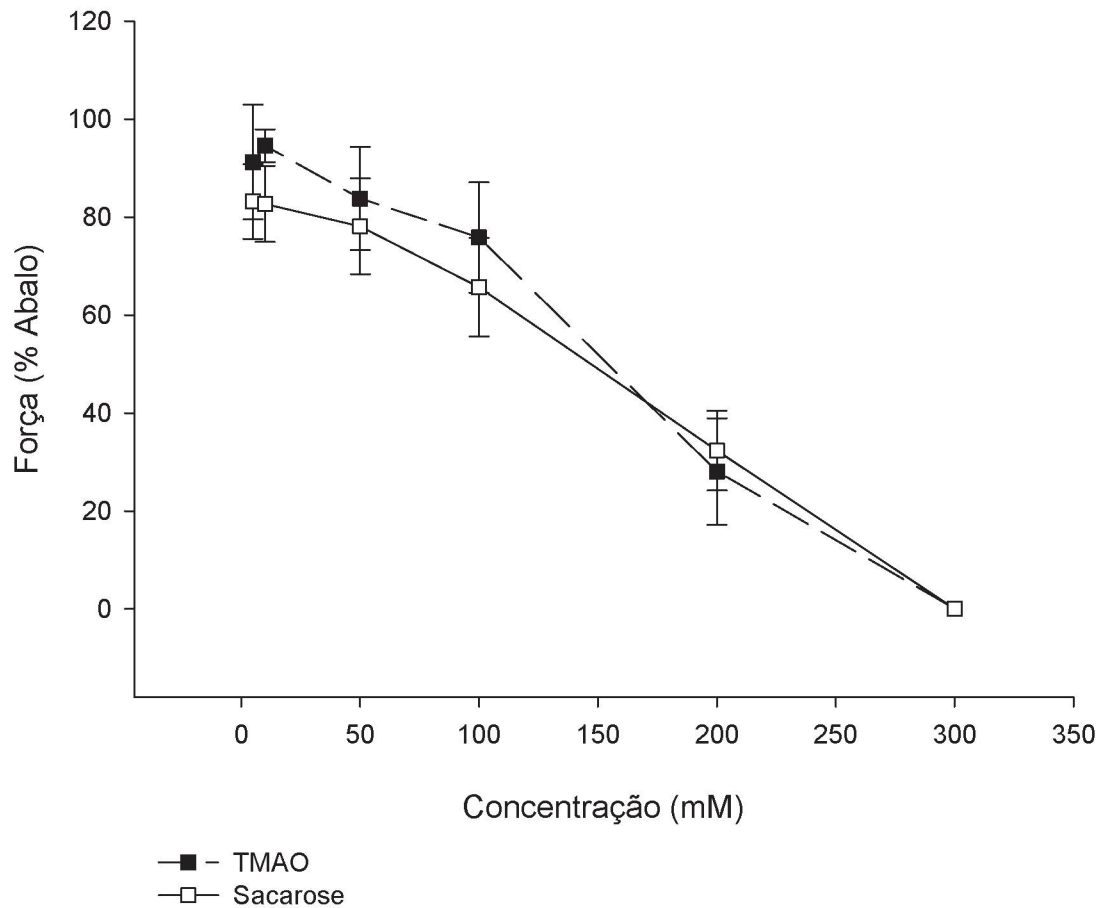


Figura 24. Representação gráfica dos dados de produção de força gerada nas preparações de nervo frênico/músculo diafragma estimulados indiretamente e expostos à soluções hipertônicas, ajustadas com TMAO ou sacarose. Os dados foram normalizados para a força muscular obtida em solução isotônica de Tyrode e estão expressos em valores percentuais como a média \pm erro padrão.

EFEITO DO TMAO E DA SACAROSE NA AMPLITUDE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EEI

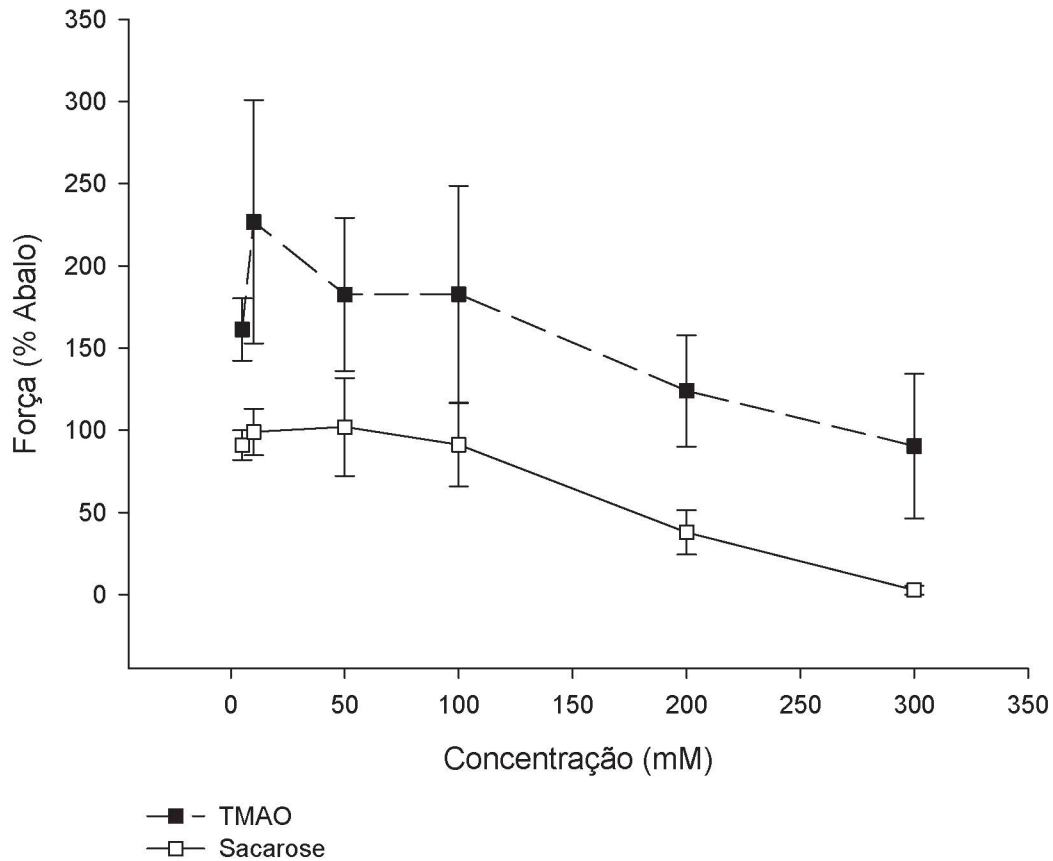


Figura 25. Representação gráfica dos dados de produção de força muscular máxima induzida por EEI, em músculo diafragma de rato exposto à soluções hipertônicas ajustadas com TMAO ou sacarose. Os dados foram normalizados para o percentual de força do abalo obtido em solução isotônica de Tyrode, e estão expressos como média \pm erro padrão. A amplitude máxima de contração muscular é igual ao somatório da força obtida no abalo mais a força basal.

4.6. Efeito do TMAO na produção de força muscular induzida por EED

O efeito do óxido de trimetilamina sobre a produção de força induzida por EED está apresentado na Figura 26. Os dados demonstram que de forma concentração-dependente tanto o TMAO quanto a sacarose induziram uma diminuição da força de contração muscular. Nestes experimentos não foram observados aumentos da contração basal como visto nos experimentos induzidos por estimulação elétrica indireta. Visto que neste experimento, as fibras foram imersas em soluções contendo DTB 60 µg, acredita-se que o aumento na contração basal esteja relacionado a efeito sobre as proteínas presentes em região de placa motora, efeito este abolido com o bloqueio realizado pela DTB em placa motora. Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

EFEITO DO TMAO E DA SACAROSE NA PRODUÇÃO DE FORÇA MUSCULAR INDUZIDA POR EED

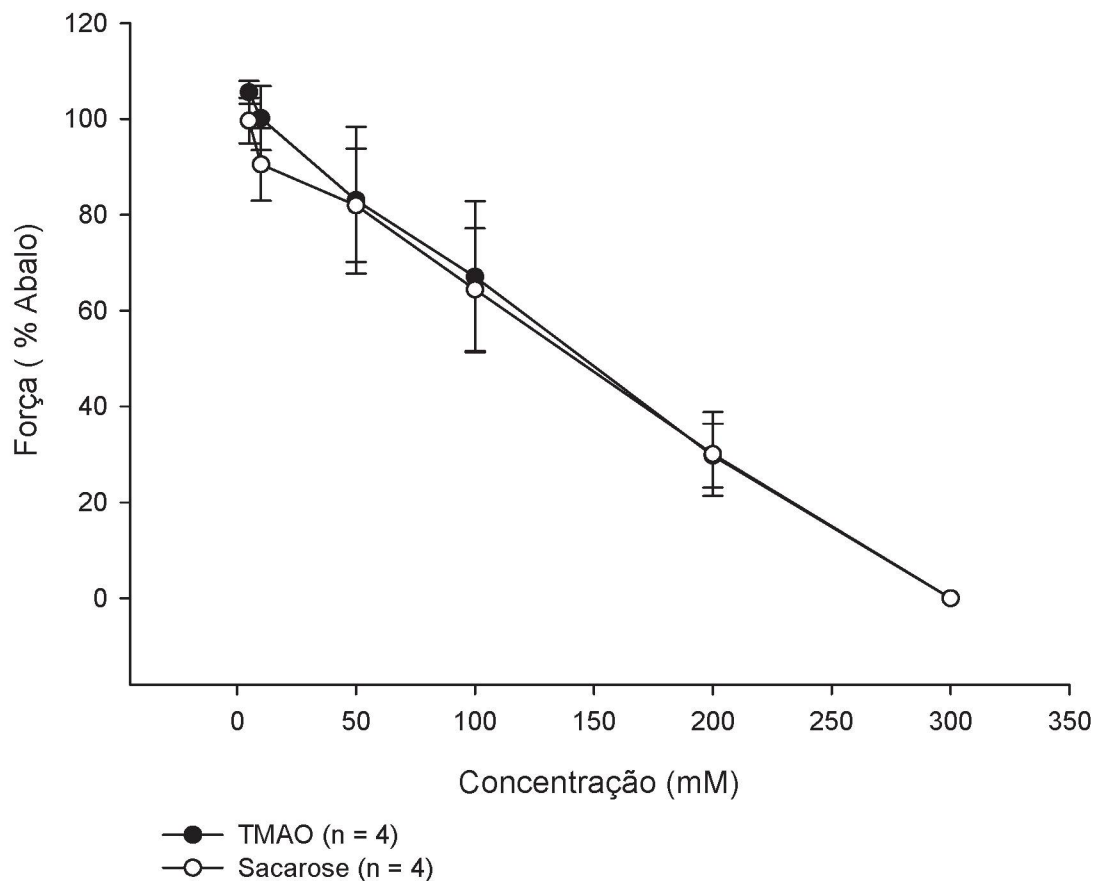


Figura 26. Representação gráfica dos dados de produção de força muscular induzida por EED, em músculo diafragma de rato exposto a soluções hipertônicas, ajustadas com TMAO ou sacarose. Os dados foram normalizados para o percentual de força muscular obtido em solução T, e estão expressos como média \pm erro padrão.

4.7. Efeito da betaína e da sacarose em fibra muscular esquelética desmembranada com uso de saponina:

Os registros originais de experimentos em fibra muscular esquelética desmembranada com uso de saponina são mostrados na Figura 27. Inicialmente, as preparações foram expostas à sol.L acrescida de cafeína (30 mM) objetivando a obtenção de resposta contrátil máxima. A seguir, empregou-se uma concentração de cafeína capaz de produzir uma resposta contrátil submáxima (3 mM). Tanto a betaína quanto a sacarose (100 mM) foram incapazes de potencializar a força de contração muscular quando em presença de cafeína (3 mM). Por outro lado, quando comparadas entre si, a amplitude da força de contração muscular induzida pela sacarose e pela betaína (100 mM) na presença de cafeína (3 mM) são praticamente iguais (Figuras 28 e 29). Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

REGISTRO ORIGINAL DE UM EXPERIMENTO DE FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA DESMEMBRANADA COM USO DE SAPONINA

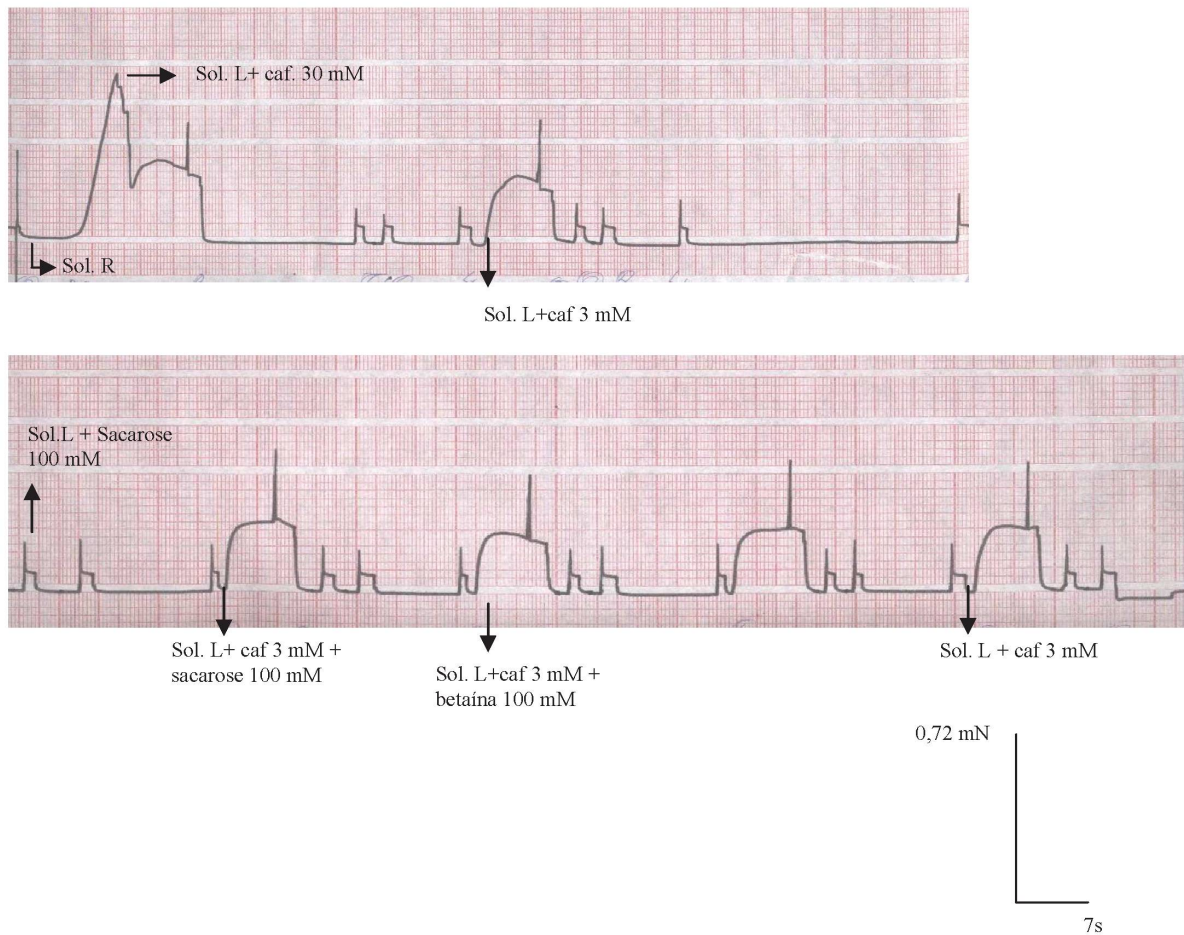


Figura 27. Registro original de experimento típico de produção de força muscular de fibra muscular desmembranada com uso de saponina, induzida por cafeína (3 mM), na ausência ou na presença de betaína ou sacarose (100 mM).

EFEITO DA BETAÍNA E DA SACAROSE NA PRODUÇÃO DE FORÇA MUSCULAR DE FIBRA DESMEMBRANADA COM SAPONINA (REPRESENTAÇÃO GRÁFICA COM DADOS NORMALIZADOS EM RELAÇÃO À CAFEÍNA 30 mM)

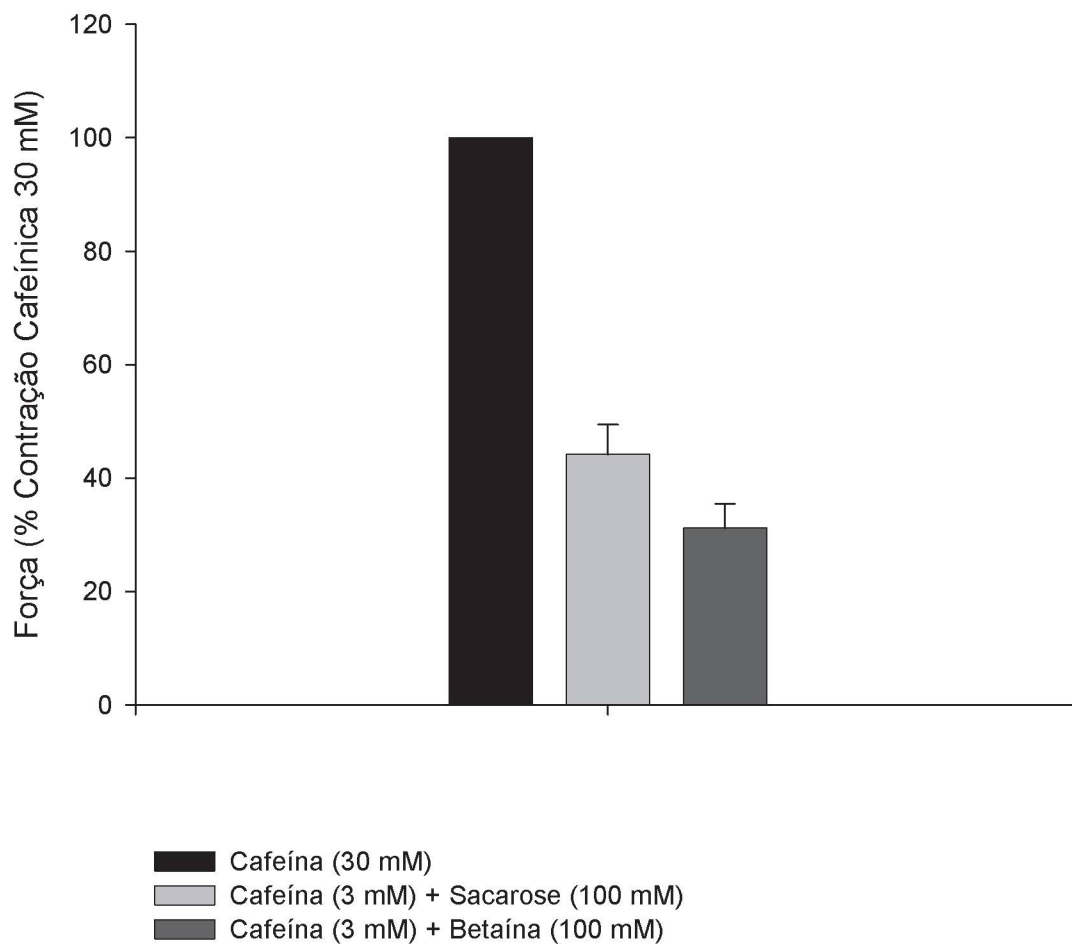


Figura 28. Representação gráfica dos dados de produção de força muscular de fibra desmembranada com saponina em soluções hipertônicas ajustadas com betaína ou sacarose (100 mM). Os dados foram normalizados para as contrações obtidas em solução contendo cafeína (30 mM).

EFEITO DA BETAÍNA E DA SACAROSE NA PRODUÇÃO DE FORÇA MUSCULAR DE FIBRA DESMEMBRANADA COM SAPONINA (REPRESENTAÇÃO GRÁFICA COM DADOS NORMALIZADOS EM RELAÇÃO À CAFEÍNA 3 mM)

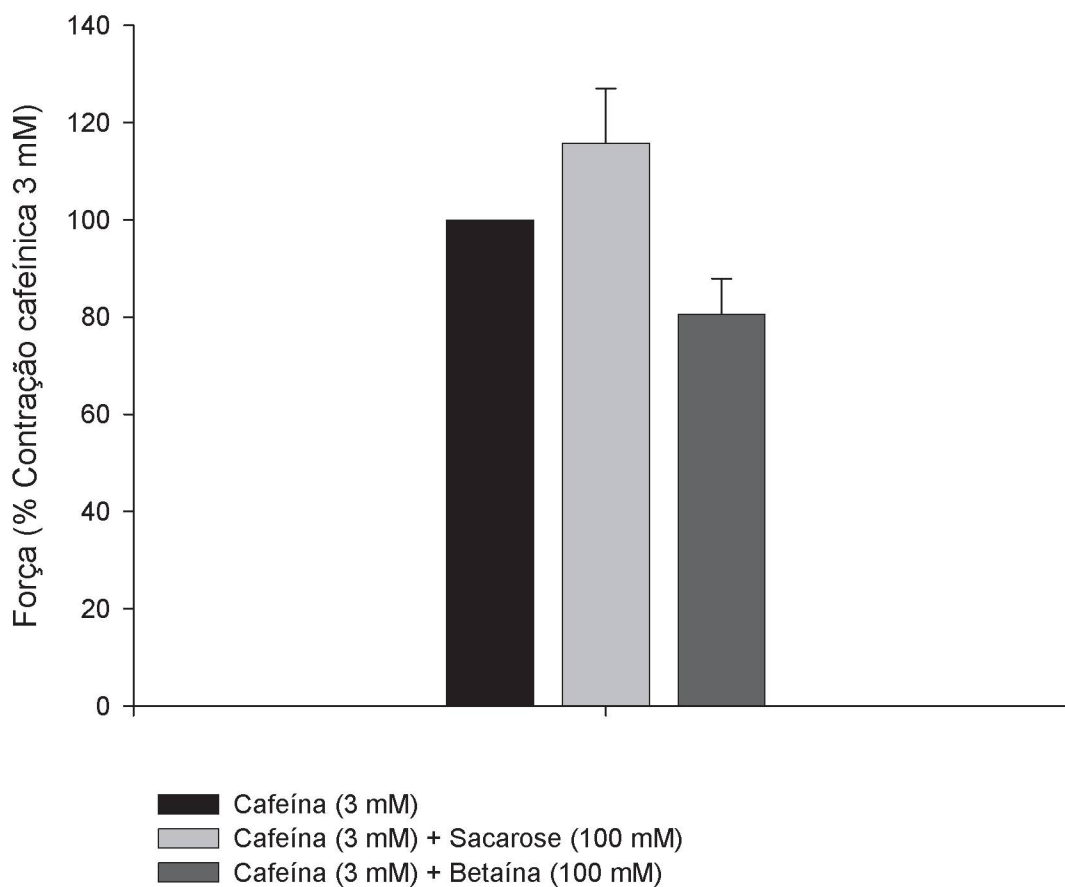


Figura 29. Representação gráfica dos dados de produção de força muscular de fibra desmembrada com saponina em soluções hipertônicas ajustadas com betaína ou sacarose (100 mM). Os dados foram normalizados para as contrações obtidas em solução contendo cafeína (3 mM).

V. DISCUSSÃO

A perfeita funcionalidade celular depende de um estado de equilíbrio entre os meios extracelular e intracelular. As células de mamíferos são banhadas por um fluido extracelular com osmolaridade relativamente constante. Qualquer desequilíbrio na osmolaridade intra ou extracelular é acompanhado de movimento de água através das membranas celulares com conseqüentes alterações no volume celular (Lang *et al.*, 1998). As alterações no volume ocorrem não somente por alterações na tonicidade do meio extracelular, mas também na diferenciação celular, apoptose, hipertrofia ou atrofia celular e para manter seu volume as células criaram mecanismos reguladores do mesmo (O'Neill, 1999). Dentre estes mecanismos, destaca-se o transporte iônico através da membrana. Quando a célula é exposta a um meio hipertônico, esta inicialmente murcha e então, por meio de aumento regulatório do volume celular (RVI), aproxima-se do seu volume original (Lang *et al.*, 1998). Esta regulação ocorre através de transportadores de íons (Na^+ , K^+ e Cl^-) presentes na membrana plasmática (O'Neill, 1999). Durante o RVI, há um aumento da concentração iônica intracelular. Este aumento é limitado, pois a alta concentração iônica interfere na estrutura e na função das macromoléculas (Lang *et al.*, 1998). Para lograr estes efeitos contrários à funcionalidade celular, as células produzem substâncias denominadas osmólitos. Os osmólitos são substâncias designadas a contrabalancear os efeitos de alterações da osmolaridade sem comprometer as funções celulares, mesmo em altas concentrações (Pierce *et al.*, 1999). O maior exemplo de atuação de osmólitos em mamíferos está relacionado às células da medula renal, as quais permanecem em meio hipertônico podendo conter uréia a 5,4 molar. A sobrevivência destas células é possível devido à presença de osmólitos neutralizadores que atuam contra os efeitos deletérios da uréia (Rösgen *et al.*, 2005)

As células musculares sofrem alterações importantes quando expostas a altas tonicidades, não somente em seu volume, mas também na capacidade de geração de força (Caputo, 1968; Gordon & Godt, 1970; Homsher *et al.*, 1974). Estudos demonstram que esta alteração na capacidade de produção de força está relacionada com alterações no processo AEC e/ou na capacidade de desenvolvimento de força pelo sistema contrátil (Gordon & Godt, 1970; Homsher, 1974; Godt *et al.*, 1984).

Visando analisar os efeitos da hipertonicidade sobre o processo de AEC foram realizados experimentos em músculo esquelético de ratos. O aumento da tonicidade foi obtido com a adição de osmólitos naturais (betaína, TMAO ou sacarose) à solução isotônica. A realização do presente estudo foi motivada por estudos anteriormente realizados neste laboratório de Fisiologia da Contração Muscular com a utilização de TMAO, nos quais observou-se que o TMAO (100 mM) é capaz de potencializar a força de contração induzida por potássio ou cafeína em músculo sartório de rã (Lunkmoss, 2002), bem como aumentar a amplitude máxima de contração induzida por EEI em músculo reto-abdominal de rã (Zamproni, 2004). Portanto a questão central era se os osmólitos naturais betaína e TMAO produziram ou não o mesmo efeito potencializador da força muscular ou agiriam como osmólitos compatíveis em músculo estriado esquelético de mamíferos. Osmólitos compatíveis são substâncias naturais que independente de sua concentração, não induz a alterações estruturais e/ou juncionais nas proteínas presentes no meio intra e/ou extracelular (Yancey, 2005).

Assim sendo, foram realizados experimentos em músculo diafragma de rato tanto com fibras intactas quanto com fibra desmembranada. Os experimentos de produção de força muscular induzida por substituição isotônica do NaCl por KCl (100 mM) realizados em músculo diafragma de rato mostraram aumento na produção de força com a adição de sacarose ou betaína 100 mM em relação à força obtida em solução isotônica. Estes dados

mostram que a betaína age como agente compatível, pois a fibra exposta à solução hipertônica não só produz força, mas esta é potencializada. Nestes experimentos, a força gerada pelas fibras em solução hipertônica ajustada com betaína foi maior do que a força gerada pelas fibras em solução hipertônica ajustada com sacarose. Estes experimentos mostraram que não há apenas um efeito da tonicidade, uma vez que os resultados obtidos entre os tratamentos foram diferentes. Tem sido demonstrado que o aumento da tonicidade do meio extracelular reduz a produção de força induzida por despolarização do sarcolema por KCl (Gordon & Godt, 1970; Suarez-Kurtz & Sorenson, 1977b; Vaughan *et al.*, 1983). Entretanto, outros autores demonstraram um aumento na produção de força, não apenas em condições experimentais semelhantes, como também na contração caféinica (Caputo, 1966; Kita *et al.*, 1982).

A cafeína é frequentemente utilizada para induzir a liberação de íons cálcio do RS em fibras intactas e desmembranadas (Caputo, 1966; Gordon & Godt, 1970; Kita *et al.*, 1982; Godt *et al.*, 1993; Chawla *et al.*, 2001). Esta promove a contração sem alterações no potencial de membrana e em concentrações menores potencializa a liberação de íons cálcio induzida pela despolarização da membrana (Rios & Pizarro, 1991). Nagasaki e Kasai, em 1983, em estudos com vesículas do RS sugeriram que a cafeína aumentava a liberação de Ca^{2+} presumivelmente pelo aumento da afinidade do sítio ativador no RS pelos íons cálcio.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram a potencialização da contração caféinica, com o aumento da tonicidade do meio. Tais resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Caputo, 1966 e Chawla *et al.*, 2001. De acordo com Caputo, 1966, a hipertoncividade produz alterações no RS, mas estas não interferem na difusão da cafeína ao longo do RS e sim poderiam facilitar a ação da cafeína na indução de contração. Chawla *et al.*, 2001, demonstraram que as soluções hipertônicas ajustadas com sacarose induziram o aparecimento de oscilações na concentração de íons cálcio intracelular, em músculo

esquelético de rã. Tais oscilações mantiveram-se independentes à presença de Ca^{2+} extracelular ou à atividade elétrica do sarcolema, persistindo na presença de bloqueadores do receptor DHPR, bloqueadas com inibidores do receptor RyR, contudo estas oscilações eram aumentadas na presença de cafeína. Estes efeitos foram atribuídos às soluções hipertônicas que poderiam estar potencializando o mecanismo de liberação de cálcio induzido por cálcio (CICR). Efeitos semelhantes foram demonstrados por Godt *et al.*, 1993. Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que as soluções hipertônicas potencializaram a contratura cafeínica indicando que o mecanismo de CICR poderia estar envolvido, visto que soluções hipertônicas reduzem a fenda entre as membranas do túbulo T e RS, conforme demonstrado por Chawla *et al.*, 2001. Podemos sugerir ainda que a betaína esteja novamente estabilizando a estrutura protéica celular, em razão da potencialização da contração em 40 %. Enquanto com a sacarose obtivemos um aumento três vezes maior na produção de força, em experimentos anteriormente realizados neste laboratório com TMAO, o aumento obtido foi de até vinte vezes maior que a contratura cafeínica em solução isotônica. Portanto, as diferenças na magnitude das potencializações das contraturas induzidas por soluções hipertônicas sugerem a existência de múltiplos mecanismos envolvidos em tal atividade.

Nos experimentos de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta e direta, em soluções hipertônicas ajustadas com sacarose ou betaína, não observamos a potencialização da produção de força em relação aos experimentos anteriores. Tais experimentos mostraram a diminuição da força de contração muscular de forma concentração-dependente. Esta redução tem sido relacionada a alterações na capacidade intrínseca do aparato contrátil desenvolver tensão através de alterações na força iônica intracelular (Gordon *et al.*, 1973; Coutinho *et al.*, 1982; Godt *et al.* 1984; Piazzesi *et al.*, 1994). Howarth, em 1958, sugeriu que as soluções hipertônicas, por causarem movimento de água para o meio extracelular, concentrariam sal dentro das células e afetariam diretamente a

interação do aparato contrátil, causando assim uma diminuição na tensão. Alguns autores ressaltam que o aumento da força iônica pode deprimir ou até mesmo inibir a atividade ATPásica da cabeça da miofibrila, (Gordon *et al.*, 1973; Homsher *et al.*, 1974; Vaughan *et al.*, 1983). Godt & Maughan, 1981, em experimento com células desmembranadas, demonstraram que em alta osmolaridade há uma redução no espaço entre os filamentos, diminuindo o desenvolvimento de força ativado por íon cálcio. Acredita-se que esta redução na capacidade máxima de força seja decorrente de uma alteração na angulação da cabeça da miosina ao ligar-se com actina, impedindo a ciclagem das pontes transversas e conseqüentemente diminuição na tensão muscular. O aumento na força iônica poderia influenciar, também, as interações proteína-proteína entre os receptores RyR e DHPR, bem como as proteínas acessórias que interagem com a proteína RyR na membrana do RS (Chawla *et al.*, 2001).

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que a concentração de betaína ou sacarose necessária para produzir 50% de inibição da força máxima foi de aproximadamente 125 mM para ambos os compostos nos experimentos de contração de EED e EEI. Entretanto, a contratatura cafeínica submáxima obtida na presença de sacarose ou betaína (100 mM) foi potencializada. Caputo, 1968, sugere que o aumento na força iônica no interior da célula devido à perda de água pode afetar tanto as estruturas das proteínas contráteis, como também das proteínas presentes no RS, comprometendo dessa forma o AEC. Assim as respostas de contração induzidas pela despolarização da membrana, por estimulação elétrica indireta ou direta, seriam afetadas. Enquanto a contração induzida por cafeína não seria afetada, já que esta age diretamente na liberação de íons cálcio (Caputo, 1968). Com o murchamento das fibras por um aumento da tonicidade ainda maior, o aumento da força iônica pode agir diretamente nas proteínas contráteis, reduzindo assim a força de contração. De acordo com a hipótese que para certas concentrações de soluto haveria alterações ou não na funcionalidade do aparato contrátil, não podemos descartar as propriedades biofísicas das proteínas. Rösger

et al., 2005, afirma que o mecanismo de ação de osmólitos protetores (ex: TMAO, betaína) muda de acordo com a concentração do mesmo. A estabilização das proteínas pelos osmólitos protetores através do mecanismo de hidratação é pequena quando os osmólitos estão em baixas ou altas concentrações. Nossos dados estão em concordância com esta afirmativa, pois a betaína, sendo um osmólito protetor, em uma concentração 100 mM atua estabilizando o processo AEC, como visto nas contraturas potássica e cafeínica, já em concentrações maiores podemos observar a diminuição de sua atuação pela diminuição na tensão muscular. Em fibras desmembradas com uso de saponina, podemos observar os efeitos estabilizadores dos osmólitos betaína e sarcosina. Foram utilizadas concentrações intermediárias (50 e 100 mM) de osmólito. Não houve potencialização da produção de força muscular em ambos os tratamentos, contudo não observamos efeitos deletérios sobre as proteínas contráteis, uma vez que a produção de força obtida manteve-se semelhante à produção em solução isotônica controle, confirmando a função de estabilizador dos osmólitos empregados. Godt *et al.*, 1993, demonstraram que osmólitos naturais, como TMAO, protegem as proteínas contra a desestabilização protéica por altas concentrações de sal ou outros desnaturantes.

Nos experimentos com estimulação elétrica direta ou indireta, foram utilizadas concentrações crescentes de solutos, sendo as fibras imersas em soluções hipertônicas por tempo prolongado. Com o intuito de descartar os efeitos em função do tempo de exposição à hipertonidade, foram realizados experimentos com eletroestimulação direta ou indireta, nos quais adicionava-se osmólito (300 mM) subitamente na solução controle. Como foi descrito por Länergren & Noth, em 1973, nossos registros também demonstraram um aumento na contração basal, que segundo estes autores, deve-se à ativação assíncrona das fibras musculares e à maior liberação de íons cálcio do RS. Além disso, os íons cálcio não são recaptados adequadamente pela organela devido às alterações do RS pelo aumento da tonicidade no meio intracelular.

Tem sido proposto que os osmólitos naturais, incluindo betaína, TMAO e sarcosina, possuem a propriedade de aumentar o enovelamento das proteínas, sendo este efeito denominado efeito osmofóbico (Celinski & Scholtz, 2002). Este efeito é caracterizado pela interação desfavorável entre o osmólito e o eixo central do peptídeo, gerando uma força termodinâmica solvofóbica. O eixo central peptídico é exposto no seu estado desnaturado ao osmólito, o efeito osmofóbico preferencialmente aumenta a energia livre do estado desnaturado, levando o equilíbrio a favor do estado protéico nativo (Bolen & Baskakov, 2001). Baskakov *et al*, 1998 demonstrou que a interação entre TMAO e o eixo central do peptídeo promovia uma alta força para minimizar a exposição do eixo a este soluto. Isto é, existe uma força de repulsão entre o estabilizador e o eixo central do peptídeo (força termodinâmica desfavorável) e devido a esta repulsão a proteína tende a compactação reduzindo a exposição do seu eixo central. Segundo Timasheff (2002), existe um sistema ternário água-proteína-soluto que é regido por ligações termodinâmicas, sendo estas favoráveis (osmólitos desestabilizadores, como a uréia e outros sais) ou desfavoráveis (osmólitos estabilizadores). Yancey, 2005, enfatiza que os osmólitos estabilizadores não se ligam às proteínas, mas sim são excluídos da camada de hidratação protéica (moléculas de água adjacentes a superfície protéica). Bolen & Baskakov, 2001, Celinski & Scholtz, 2002, ressaltam que os osmólitos protetores possuem maior ou menor capacidade osmofóbica, demonstrando que as metilaminas, principalmente o TMAO, são capazes de manter em maior grau a conformação nativa protéica.

Com intuito de analisarmos os efeitos do TMAO em músculo de mamíferos, foram realizados experimentos com estimulação elétrica direta e indireta na presença deste osmólito. Sob estimulação elétrica direta, não observamos diferença significativa entre os tratamentos com TMAO, sacarose ou betaína.

Nos experimentos de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta em solução contendo TMAO, em concentrações crescentes, podemos notar o efeito estabilizador do osmólito. Nossos dados demonstraram que na presença de TMAO (5-150 mM) é mantida a funcionalidade da maquinaria contrátil estimulada indiretamente (via estimulação elétrica nervo frênico/diafragma). Outro dado interessante foi o aumento da contração basal, que se manteve praticamente constante independente da concentração utilizada, sendo esta duas vezes maior que a contração controle. A amplitude máxima de contração (somatório entre contração basal e abalo) se manteve aumentada, apesar da diminuição do abalo. Estes dados confirmam a teoria de Bolen & Baskakov, 2001, sobre o TMAO ser mais efetivo que outros osmólitos, como sacarose, betaina e sarcosina.

O mecanismo de estabilização protéica pelo TMAO é explicado pelo seu efeito osmofóbico. De acordo com a força termodinâmica desfavorável, o TMAO é excluído da camada de hidratação da proteína, e envolvido por uma camada de água ao seu redor diminuindo a exposição do substrato à água (Yancey, 2005). Alterando a camada de solvatação em torno das proteínas, o TMAO desfavorece a competição entre água-proteína e pontes de hidrogênio entre proteína-proteína. Dessa forma, o osmólito diminui as pontes de hidrogênio água-proteína e aumenta as pontes intraproteína, resultando numa maior estabilização protéica (Bennion *et al*, 2004; Gonnelli & Strambini, 2001).

Como descrito anteriormente, o aumento na contração basal deve-se a uma maior concentração de íons cálcio no meio intracelular (Lännergren & Noth, 1973). Este aumento pode ocorrer por um déficit na recaptação do Ca^{2+} livre ou um aumento na entrada de cálcio intracelularmente. Sabe-se que alterações devido à hipertonicidade ocorrem não somente na membrana celular, mas também nas organelas celulares. Poderíamos, então, atribuir tal déficit de recaptação a uma alteração na SERCA (bomba transportadora de Ca^{2+} /ATPase do RS), porém notaríamos o aumento da contração basal em todos os

experimentos de eletroestimulação realizados nesta pesquisa. Uma outra hipótese seria se o TMAO atuasse protegendo esta proteína no RS e mantivesse sua função inalterada, porém este osmólito, devido a seu peso molecular, não atravessa a membrana celular. Supomos então que o mecanismo mais provável seria um aumento na entrada de íons cálcio no citosol pelos receptores nicotínicos. Observamos que o efeito de aumento da contração basal não se repetia nos experimentos realizados com EED. Baseados nestas duas afirmativas, sugerimos que o TMAO esteja agindo a nível de receptor nicotínico, na placa motora. Assim, o TMAO estaria estabilizando esta proteína, influenciando seu estado conformacional, mantendo-a ativa para a entrada de íons cálcio no interior da célula. Allard e colaboradores, em 1996, demonstraram a atividade de receptores nicotínicos na placa motora, sendo que em condições fisiológicas de $[Ca^{2+}]$ extracelular, o Ca^{2+} entra na célula pelos receptores nicotínicos aumentando a concentração interna local do mesmo íon. Esta concentração interna de íons cálcio é suficiente para abertura dos canais de K^+ induzidos por Ca^{2+} .

Estudos com sacarose demonstram que este osmólito também é capaz de alterar a interação proteína-solvente, sem induzir mudanças conformacionais protéicas. Termodinamicamente, significa que a sacarose age desfavoravelmente na interação com a proteína, sendo excluída da camada de hidratação protéica e assim age diminuindo o desnovelamento protéico e favorecendo a força de enovelamento (Lee & Timasheff, 1981). Tais estudos estão em concordata com os experimentos realizados nesta pesquisa, nos quais observamos que a sacarose age como osmólito estabilizador tanto em fibras intactas (contração com alta concentração de K^+ ou induzida por cafeína) quanto em fibras desmembranadas, preservando a força de contração muscular.

Nossos estudos, portanto, demonstram que os osmólitos podem atuar como estabilizadores protéicos em células musculares de mamíferos, mantendo sua capacidade de produção de força dependendo das concentrações empregadas. Porém ressaltamos que os

osmólitos possuem características próprias, as quais interferem na sua atividade osmofóbica, podendo esta ter alta magnitude como TMAO e betaína ou menor magnitude como sacarose. Devido a estas peculiaridades, estudos posteriores deverão ser realizados a fim de elucidar os mecanismos envolvidos entre as interações proteínas-osmólitos-solvente.

CONCLUSÃO

Neste estudo avaliamos o efeito do aumento da tonicidade do meio obtido com adição de betaína, sacarose e TMAO (óxido de trimetilamina) na transmissão neuromuscular e no processo de AEC de músculo esquelético de mamíferos. A betaína é um osmólito estabilizador da classe das metilaminas, encontrado em microorganismos expostos a estresse de temperatura e/ou alta salinidade e plantas de áreas áridas e salinas (Holmström *et al*, 2000). Em condições hiperosmóticas, ela protege a atividade da miosina ATPase de músculo esquelético na presença de baixa concentração de uréia plasmática tão bem quanto previne mudanças estruturais na miosina em altas concentrações de uréia (Ortiz-Costa *et al*, 2002). Podendo atuar também, contra os efeitos da uréia na medula renal de mamíferos (Yancey, 2005). Bolen & Baskakov (2001) descreveram o efeito osmofóbico dos osmólitos estabilizadores, classe na qual a betaína está inclusa. Este efeito está relacionado com a interação desfavorável entre o osmólito e a proteína, dessa maneira o osmólito pode agir aumentando o valor constante de enovelamento da proteína, a ponto dela tornar-se mais compacta. Na presente pesquisa estudamos os efeitos do TMAO, da betaína e da sacarose na transmissão neuromuscular, no processo AEC e nas proteínas contráteis.

Na presente pesquisa concluímos que os osmólitos estudados parecem ser compatíveis com a espécie estudada; uma vez que a funcionalidade, ou seja a contratilidade do músculo foi mantida quando da presença destes osmólitos em soluções contendo concentrações menores que 100 mM.

A betaína e a sacarose parecem estabilizar o AEC quando presentes em baixas concentrações (< 100 mM), visto que a contratatura potássica e cafeínica foram potencializadas em preparações de músculo intacto.

Em concentrações maiores que 100 mM ambos os osmólitos diminuíram a capacidade máxima de produção de força de forma dose dependente quando o músculo era estimulado eletricamente direta ou indiretamente. Isto confirma o efeito deletério do aumento da tonicidade do meio extracelular sobre as células, independente do osmólito utilizado, fato que está em concordância com Rösger *et al*, 2005, que mostra que a contribuição da hidratação para estabilização de proteínas feita por osmólitos protetores é pequena em concentrações muito altas.

Em fibras musculares esqueléticas desmembranadas com saponina, a sacarose (100 mM) potencializou a contratura cafeínica. Isto indica que além do efeito potencializador a nível de transmissão do sinal dos DHPRs para os RyRs, ela também possui efeito potencializador sobre a liberação de cálcio do RS. Porém, a betaina não mostrou este último efeito.

O TMAO e a sacarose diminuíram a produção de força muscular (abalo) quando a contração era induzida por EEI, de forma dose dependente, sendo que 50 % de inibição de força correspondeu a aproximadamente a 150 mM de ambos os solutos. O TMAO promoveu aumento na contração basal nos mesmos experimentos, que relacionamos a priori a um efeito provavelmente a nível de placa motora, pois quando a fibra foi estimulada diretamente não houve aumento da contração basal. O mesmo efeito não foi visto com a adição de sacarose. A amplitude máxima de contração foi elevada com a adição de TMAO e não com sacarose, sendo provavelmente este efeito consequência do aumento da contração basal.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que a tonicidade não é o único fator responsável pelas alterações no processo de transmissão neuromuscular ou do processo de AEC, e que estas alterações dependem do osmólito empregado.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahern, G.P., Junankar, P.R. & Dulhunty, A.F. (1994). Single channel activity of ryanodine receptor calcium release channel is modulated by FK-506. *FEBS Lett.* **352**, 369-374.
2. Alfieri, R.R., Cavazzoni, A., Petronini, P.G., Bonelli, M.A. *et al.* (2002). Compatible osmolytes modulate the response of porcine endothelial cells to hypertonicity and protect them from apoptosis. *J. Physiol.* **540**, 499-508.
3. Allard, B., Bemengo, J.C., Rougir, 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 fibers. *J. Physiol.* **494**, 337.
4. 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.
5. 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.
6. Ashley, C.C., Mulligan, I.P. & Lea, T.J. (1991). Ca^{2+} and activation mechanisms in skeletal muscle. *Q. Rev. Biophys.* **24**, 1-73.
7. Avila, G., Lee, E.H., Perez, C.F., Allen, P.D. & Dirksen, R.T. (2003). FKBP12 binding to RyR modulates excitation-contraction coupling in mouse skeletal myotubes. *J. Biol. Chem.* **278**, 22600-22608.
8. Barton, K.N., Buhr, M.M. & Ballantyne, J.S. (1999). Effects of urea and trimethylamine N-oxide on fluidity of liposomes and membranes of an elasmobranch. *Am. J. Physiol.* **276**, R397-R406.
9. 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. *Biophys. J.* **74**, 2666-2673.
10. 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, *Callorhinaes millii* (Elasmobranchii, Holocephali). *Comp. Bioch. Physiol. Part B* **119**, 521-526.
11. Bennion, B.J., De Marco, M.L. & Daggett, V. (2004). Preventing misfolding of the prion protein by trimethylamine N-oxide. *Biochemistry.* **43**, 12955-12963.

12. Berchtold, M.W., Brinkmeier, H. & Müntener, M. (2000). Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity and disease. *Physiol. Rev.* **80**, 1215-1265.
13. Bers, D.M., Lederer, W.J. & Berlin, J.R. (1990). Intracellular Ca^{2+} transients in rat cardiac myocytes: role of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in excitation-contraction coupling. *Am. J. Physiol.* **258**, C944-C954.
14. Bolen, D.W. & Baskakov, I.V. (2001). The osmofobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J. Mol. Biol.* **310(5)**, 955-963.
15. 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. Zool.* **208**, 137-152.
16. 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. *Bas. Res. Cardiol.* **81**, 1-15.
17. Brenner, B. (1988). Effect of Ca^{2+} on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fiber: Implications for regulation of muscle contraction. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA.* **85**, 3265-3269.
18. 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.
19. Burg, M.B. & Peters, E.M. (1997). Urea and methylamines have similar effects on aldose reductase activity. *Am. J. Physiol.* **273**, 1048-1053.
20. Caputo, C. (1966). Caffeine and potassium-induced coontractures of frog striated muscle fibers in hypertonic solutions. *J. Gen. Physiol.* **50**, 129-139.
21. Caputo, C. (1968). Volume and twitch tension changes in single muscle fibers in hypertonic solutions. *J. Gen. Physiol.* **52**, 793-809.
22. Celinsk, S.A. & Scholtz, J.M. (2002). Osmolyte effects on helix formation in peptides and the stability of coiled-coils. *Prot. Sci.* **11**, 2048-2051.
23. 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.

24. 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.
25. Cooke, R. (1997). Actomyosin interaction in striated muscle. *Am. Physiol. Soc.* **77**, 671-697.
26. Coronado, R., Morissette, J., Sukhareva, M. & Vaughan, D. M. (1994). Structure and function of ryanodine receptors. *Am. Physiol. Soc.* **266**, C1485-C1504.
27. Craig, S.A.S. (2004). Betain in human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 539-549.
28. Dirksen, R.T. (2002). Bi-directional coupling between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors. *Front. Biosci.* **7**, d659-d670.
29. Dulhunty, A.F., Haarmann, C.S., Green, D., Laver, D.R. *et al.* (2002). Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. *Prog. Bio. Mol. Biol.* **79**, 45-75.
30. 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. *J. Gen. Physiol.* **78**, 457-497.
31. 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.
32. 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. (Lond.)* **276**, 233-255.
33. Favero, T.G. (1999). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and muscle fatigue. *J. Appl. Physiol.* **87**(2), 471-483.
34. 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.
35. Fill, M. & Copello, J.A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* **82**, 893-922.

36. Fogaça, R.T.H., Cavalcante, A.D.A., Serpa, A.K.L., Sousa, P.J.C., *et al.* (1997). The effects of essential oil of *Mentha x villosa* on skeletal muscle of the toad. *Phytoter.Res.* **11**, 552-557.
37. Franzini-Armstrong, C. & Protasi, F. (1997). Ryanodine receptors of striated muscle: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol.Rev.* **77**, 699-729.
38. Garcia, M.C., Carrillo, E., Galindo, J.M., Hernández, A., *et al.* (2005). Short-term regulation of excitation-contraction coupling by the β_{1a} -subunit in adult mouse skeletal muscle. *Biophys.J. BIOFAST*. 10.1529/biophysj.105.067116.
39. Garcia, R., Carrilo, E., Rebolledo, S., Garcia, M.C. & Sanchez, J.A. (2002). The β_{1a} -subunit regulates the functional properties of adult frog and mouse L-type Ca^{2+} channels os skeletal muscle. *J. Physiol.* **545.2**, 407-419.
40. Glover, L., Quinn, S., Ryan, M., Pette, D. & Ohlendieck, K. (2002). Supramolecular calsequestrin complex: protein-protein interactions in chronic low-frequency stimulated muscle, postnatal development and ageing. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4607-4616.
41. Godt, R.E., Fogaça, 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.
42. Godt, R.E., Fogaça, R.T.H. & Nosek, T.M. (1991). Changes in force and calcium sensitivity in the developing avian heart. *Can. J. Physiol. Pharm.* **69**, 1692-1697.
43. 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.
44. 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. *J. Gen. Physiol.* **80**, 279-297.
45. Godt, R.E. & Maughan, D.W. (1981). Influence of osmotic compression on calcium activation and tension in skinned muscle fibers of the rabbit. *Pflug. Arch.* **391**, 334-337.
46. Gonelli, M. & Strambini, G.B. (2001). No effect of trimethylamine N-oxide on the internal dynamics of the protein native fold. *Bioph. Chem.* **89**, 77-85.
47. Gordon, A.M. & Godt, R.E. (1970). Some effects of hypertonic solutions on contraction and excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **55**, 254-275.

48. Gordon, A.M. & Godt, R.E., Donaldson, S.K.B., Harris, C.E. (1973). Tension in skinned frog muscle fibers in solutions. *J. Gen. Physiol.* **62**, 550-574.
49. Groh, S., Marty, I., Ottolia, M., Prestipino, G. *et al.* (1999). Functional interaction of the cytoplasmic domain of triadin with the skeletal ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 12278-12283.
50. Guo, W. & Campbell, K.P. (1995). Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**, 9027-9030.
51. 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.
52. Hamilton, S.L., Serysheva, I. & Strasburg, G.M. (2000). Calmodulin and excitation-contraction coupling. *News Physiol. Sci.* **15**, 281-284.
53. Holmström, K-O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T.E. & Welin, B. (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J. Exp. Bot.* **51**, 177-185.
54. 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.
55. Howarth, J.V. (1958). The behaviors of frog muscle in hypertonic solutions. *J. Physiol (Lond)*. **144**, 167.
56. Huang, C.L-H. (1992). Intramembrane charge movements in frog skeletal muscle in strongly hypertonic solutions. *J. Gen. Physiol.* **99**, 531-544.
57. Huang, C.L-H. & Peachey, L.D. (1989). Distribution of voltage-dependent membrane capacitance in frog skeletal muscle fibres. *J. Gen. Physiol.* **93**, 565-584.
58. Jaimovich, E. & Carrasco, J.A. (2002). IP₃ dependent Ca²⁺ signals in muscle cells are involved in regulation of gene expression. *Biol. Res.* **35**, 195-202.
59. Jones, L.R., Zhang, L., Samborn, K., Jorgensen, A.O. & Kelley, J. (1995). Purification, primary structure and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**, 30787.

60. Jones, S.W. (1998). Overview of voltage-dependent calcium channels. *J. Bioen. Biom.* **30**, 299-312.
61. Kamp, T.J. & Hell, J.W. (2000). Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ.Res.* **87**, 1095-1102.
62. Kettunen, K., Peuramen, S. & Tiihonen, K. (2001). Betaine aids in the osmoregulation of duodenal epithelium of broiler chicks, and affects the movement of water across the small intestinal epithelium in vitro. *Comp. Bioch. Physiol. Part A*: **129**, 595-603.
63. Kita, H., Narita, K., Van Der Kloot, W. (1982). The relation between tonicity and impulse-evoked transmitter release in the frog. *J. Physiol.* **325**, 213-222.
64. Kobayashi, Y.M., Alseikhan, B.A. & Jones, L.R. (2000). Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of Triadin 1. *J. Biol. Chem.* **275**, 17269-17246.
65. Lacampagne, A., Klein, M.G., Ward, C.W. & Schneider, M.F. (2000). Two mechanisms for termination of individual Ca²⁺ sparks in skeletal muscle. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA.* **97**, 7823-7828
66. Lamb, G.D. (2000). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* **27**, 216-224.
67. Lamb, G.D. (2002). Voltage-sensor control of Ca²⁺ release in skeletal muscle: insights from skinned fibers. *Front. Biosci.* **7**, d834-d842.
68. Lamb, G.D. & Stephenson, D.G. (1990). Calcium release in skinned muscle fibers of the toad by transverse tubule depolarization or by direct stimulation. *J. Physiol.* **423**, 495-517.
69. Lamb, G.D. & Stephenson, D.G. (1996). Effects of FK506 and rapamycin on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers of the rat. *J. Physiol. Lond* **494**, 569-576.
70. 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.
71. 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.* **281**, C207-C214.

72. Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Volkl, H., *et al.* (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**, 247-306.
73. Lännergren, J. & Noth, J. (1973). Tension in isolated frog muscle fibers induced by hypertonic solutions. *J. Gen. Physiol.* **61**, 158-175.
74. Lee, J.C. & Timasheff, S.N. (1981). The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* **256**, 7193-7201.
75. Lee, M.J., Rho, S., Shin, D.W., Cho, C. *et al.* (2004). Negatively charged amino acids within the intraluminal loop of ryanodine receptor are involved in the interaction with triadin. *J. Biol. Chem.* **279**, 6994-7000.
76. 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 apresentada à coordenação do curso de Pós-graduação em Biologia Celular – UFPR – PR.
77. Lutz, P.L. & Robertson, J.D. (1971). Osmotic constituents of the coelacanth *Latimeria Chalumnae* Smith. *Biol. Bull.* **141**, 553-560.
78. Mansson, A. (1993). Tension transients in skeletal muscle fibers of the frog at varied tonicity of the extracellular medium. *J. Musc. Reser. Cell Motil.* **14**, 15-25.
79. Mansson, A. (1989). Changes in force and stiffness during stretch of skeletal muscle fibers, effects of hypertonicity. *Biophys. J.* **56**, 429-433.
80. Meis, L. & Inesi, G. (1988). Effects of organic solvents, methylamines and urea on the affinity for Pi of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **263**, 157-161.
81. Miller, T.J., Hanson, R.D. & Yancey, P.H. (2000). Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. *Comp. Bioch. Physiol.* **Part A: 125**, 45-56.
82. Nagasaki, K. & Kasai, M. (1983). Fast release of calcium from sarcoplasmic reticulum vesicles monitored by chlortetracycline fluorescence. *J. Bioch.* **94**, 1101-1109.
83. Nakanishi, T., Turner, R.J. & Burg, M.B. (1990). Osmoregulation of betaine transport in mammalian renal medullary cells. *Am. J. Physiol.* **258**, 1061-1067.

84. O'Connell, K.M.S., Yamaguchi, N., Meissner, G. & Dirksen, R.T. (2002). Calmodulin binding to the 3614-3643 region of RyR1 is not essential for excitation-contraction coupling in skeletal myotubes. *J. Gen. Physiol.* **120**, 337-347.
85. Ogawa, Y. (1994). Role of ryanodine receptors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 229-274.
86. O'Neill, W.C. (1999). Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am. J. Physiol.* **276**, C995-C1011.
87. Oota, I., Kosaka, I., Nagai, T. & Yabu, H. (1982). Extracellular divalent cations in excitation-contraction coupling: hypertonic solutions effects. *Can. J. Physiol. Pharm.* **60**, 440-445.
88. Ortiz-Costa, Susana; Soreson M.M.; Sola-Penna Mauro (2002). Counteracting Effects of Urea and Methylamines in Function and Structure of Skeletal Muscle Myosin. *Arch. Biochem. Biophys.* **408**, 272-278.
89. 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.
90. Pierce, V.A., Mueller, L.D., Gibbs, A.G. (1999). Osmoregulation in *Drosophila melanogaster* selected for urea tolerance. *J. Exp. Biol.* **202**, 2349-2358.
91. 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.
92. Priori, S.G. & Napolitano, C. (2005). Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in intracellular Ca²⁺ release channels. *J. Clin. Invest.* **115**, 2033-2038.
93. Radermacher, M., Rao, V. Grassucci, R. Frank, J. *et al.* (1994). Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel / ryanodine receptor from skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **127**, 411-423.
94. Rios, E. & Pizarro, G. (1991). Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* **71**, 849-907.
95. Rios, E., Pizarro, G. & Stefani, E. (1992). Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 109-133.

96. Rios, E., Ma, J. & Gonzalez, A. (1991). The mechanical hypothesis of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Mus.Res. Cell Motil.* **12**, 127-135.
97. Rösgen, J., Montgomery, P. & Bolen, D.W. (2005). Protein folding, stability and solvation structure in osmolyte solutions. *Biophys. J.* **89**, 2988-2997.
98. Saad-Nehme, J., Silva, J.L. & Meyer-Fernandes, J.R. (2001). Osmolytes protect mitochondrial F₀F₁-ATPase complex against pressure inactivation. *Bioch. Biophys. Acta* **1546**, 164-170.
99. Sato, Y. & Fujino, M. (1987). Hypertonicity-induced inhibition of excitation-contraction coupling in *Xenopus* twitch fibers. *Jpn. J. Physiol.* **37**, 947-953.
100. Schneider, M. F. (1994). Control of calcium release in functioning skeletal muscle Fibers. *Annual Rev. Physiol.* **56**, 463-484.
101. Sperelakis, N. (1998). Cell Physiology. 2.^o edition, Ed. Academic Press.
102. Somlyo, A.V., Shuman, H. & Somlyo, A.P. (1977). Elemental distribution in striated muscle and the effects of hypertonicity. *J. Cell Biol.* **74**, 828-857.
103. Stange, M., Tripathy, A. & Meissner, G. (2001). Two domains in dihydropyridine receptor activate the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *Biophys. J.* **81**, 1419-1429.
104. Suarez-Kurtz, G. & Sorenson, A.L. (1977a). Effects of verapamil on excitation-contraction coupling in single crab muscle fibers. *Pflug. Arch.* **368**, 231-239.
105. 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.
106. Sutko, J.L., Airey, J.A., Welch, W. & Ruest, L. (1997). The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharm. Rev.* **49**, 53-98.
107. Tanabe, T., Beam, K.G., Adams, B.A., Niidome, T. & Numa, S. (1990). Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature*, **346**, 567-569.
108. Timasheff, S.N. (2002). Protein-solvent preferential interactions protein hydration and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *PNAS*, **99**, 9721-9726.

109. Tseng, H-C. & Graves, D.J. (1998). Natural methylamine osmolytes, trimethylamine N-oxide and betaine, increase tau-induced polymerization. *Bio. Res. Com.* **250**, 726-730.
110. Ursu, D., Sebille, S., Diatze, B., Freise, D., *et al.* (2001). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle of a mouse lacking the dihydropyridine receptor subunit γ_1 . *J. Physiol.* **533.2**, 367-377.
111. Vaughan, P.C., Bressler, B.H., Dusik, L.A. & Trotter, M.J. (1983). Hypertonicity and force development in frog skeletal muscle fibers. *Can. J. Physiol. Pharm.* **61**, 847-856.
112. Vibert, P., Craig, R. & Lehman, W. (1997). Steric-model for activation of muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.* **266**, 8-14.
113. Viires, M.A. (1998). Calcium ATPase and respiratory muscle function. *Eur. Resp. J.* **11**, 758-766.
114. Withers, P.C. & Guppy, M.(1996). Do australian desert frogs co-accumulate counteracting solutes with urea during aestivation?. *J.Exper. Biol* **199**, 1809-1816.
115. Withers, P.C., Morrison, G., Hefter, G.T. & Pang, T-S. (1994). Role of urea and methylamines in buoyancy of elasmobranches. *J. Exp. Biol.* **188**, 175-189.
116. Wolska, B. M. & Lewartowski, B. (1993). The role of sarcoplasmic reticulum and Na-Ca exchange in the Ca^{2+} extrusion from the resting myocytes of guinea- pig heart: comparison with rat. *J. Mol. Cell Cardiol.* **25**, 75-91.
117. Yamaguchi, N., Xin, C. & Meissner, G. (2001). Identification of apocalmodulin and Ca^{2+} -calmodulin regulatory domain in skeletal muscle Ca^{2+} release channel, ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 22579-22585.
118. Yamaguchi, N., Xu, L. Pasek, D.A., Evans, K.E. & Meissner, G. (2003). Molecular basis of calmodulina binding to cardiac muscle Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* **278**, 23480-23486.
119. Yamaguchi, N., Xu, L. Pasek, D.A., Evans, K.E. & Meissner, G. (2004). Different regions in skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors are involved in transducing the functional effects of calmodulina. *J. Biol. Chem.* **279**, 36433-36439.
120. Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectans in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **208**, 2818-2830.

121. 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.
122. 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.
123. Zamproni, L.N. (2004). Efeitos de soluções hipertônicas ajustadas com sacarose ou óxido de trimetilamiana (TMAO) sobre a junção neuromuscular e o acoplamento excitação-contracção de vertebrados. *Relatório Técnico-Científico Final (CNPQ)*, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 1-26.
124. Zhu, Y. & Nosek, T.M. (1992). Ruthenium red affects the contractile apparatus but not sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release of skinned papillary muscle. *Pflug. Arch.* **420**, 255-258.
125. 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.