

**ANNA RAQUEL SILVEIRA GOMES**

**EFEITOS DO EUGENOL NOS MECANISMOS DE LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO DO  
RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE ANFÍBIO**

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

**CURITIBA**

**2000**

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

Departamento de Biologia Celular  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná

---

## PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "EFEITOS DO EUGENOL NOS MECANISMOS DE LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE ANFÍBIO", de autoria da Pós-Graduanda Anna Raquel Silveira Gomes, e composta pelos Professores: Dr. Rosalvo Tadeu H. Fogaça; (como Orientador e Presidente); Dr. Albert Lee Sorenson (UFRJ); e Dr. Cláudio de Paula Soares Greca (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dr. Rosalvo Tadeu H. Fogaça, nota 10,0 (DEZ); Dr. Albert Lee Sorenson, nota 10,0 (DEZ); Dr. Cláudio de Paula Soares Greca, nota 10,0 (DEZ). De acordo com o Regimento interno do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, a candidata foi: APROVADA com a nota DEZ (10), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 14 de Dezembro de dois mil.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rosalvo Tadeu H. Fogaça

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Albert Lee Sorenson

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Cláudio de Paula Soares Greca

**ANNA RAQUEL SILVEIRA GOMES**

**EFEITOS DO EUGENOL NOS MECANISMOS DE LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO DO  
RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE ANFÍBIO**

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

**CURITIBA**

**2000**

ii

Aos meus pais  
Waldo e Conceição

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família pela força que me deram para eu conseguir chegar até aqui.

Ao meu orientador Professor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça e sua esposa Ilana Kassouf-Silva pela paciência e dedicação na orientação científica.

A toda a equipe do biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná que muito me auxiliaram na obtenção e sacrifício dos animais.

A todos os meus amigos que me ajudaram na execução desta dissertação e os que me ajudaram psicologicamente, aguentando os meus lamentos durante esses três anos. Em especial pela minha Amiga Marion que já se foi, pelo seu carinho e paciência me dando o colo tantas vezes para eu chorar.

À minha Amiga Thais por ter compartilhado comigo todos os momentos difíceis e as cenas mais cômicas nas nossas longas jornadas de laboratório.

Aos meus amigos Marcelo, Vera e Viviane que me auxiliaram na execução da microscopia eletrônica, que por alguns contratempos não foi citada nesta dissertação.

À CAPES pelo apoio financeiro ao meu trabalho, facilitando assim a execução do mesmo.

A todos os meus companheiros de laboratório que muito me ensinaram cientificamente e pelas discussões que engrandeceram muito meu trabalho.

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

## SUMÁRIO

Folhas de apresentação	i-iii
Agradecimentos	iv
Lista de abreviaturas	viii
Lista de figuras	ix-x
Lista de tabelas	xi
Resumo	xii-xiii
Summary	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Proteínas que participam do mecanismo de contração muscular	8
1.2. Acoplamento excitação-contração (AEC)	13
1.3. Teorias do AEC (Acoplamento excitação-contração)	16
1.4. Drogas utilizadas para o estudo do mecanismo de acoplamento excitação-contração	19
1.5. Objetivos	32
2. MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1. Obtenção e sacrifício dos animais	33
2.2. Músculo intacto de anfíbio	33
2.2.1. Experimentos realizados com eugenol em músculo sartório intacto de anfíbio	34
2.2.2. Experimentos realizados com perclorato em músculo sartório intacto de anfíbio	35
2.2.3. Experimentos realizados com perclorato e eugenol em músculo sartório intacto de anfíbio	36
2.2.4. Experimentos realizados com procaína em músculo sartório intacto de anfíbio	37
2.3. Preparação da fibra muscular desmembranada com uso de saponina	38
2.3.1. Protocolo Experimental	39
2.4. Preparação de fibra desmembranada com o uso de Triton X-100	42

2.5.	Soluções	44
2.6.	Reagentes Químicos	47
3.	RESULTADOS	48
3.1.	Avaliação dos efeitos do eugenol em contratura induzida por 100 mM de $K^+$ em músculo sartório isolado de rã	48
3.2.	Efeito do eugenol (10 mM) em solução contendo 4 mM de $K^+$ ou 100 mM de $K^+$ em músculo sartório isolado de rã	48
3.3.	Efeito do eugenol (3 mM) em contratura induzida por cafeína (2 mM) em músculo sartório isolado de rã	51
3.4.	Efeito do perclorato (2 mM) nas contraturas induzidas por $K^+$ (40, 80 e 100 mM) em músculo sartório isolado de rã	51
3.5.	Curva dose/resposta ao perclorato (0.1 à 150 mM) em 4 mM de $K^+$ ou em 100 mM de $K^+$ em músculo sartório isolado de rã	54
3.6.	Efeito da remoção do cálcio externo na curva dose/resposta induzida pelo perclorato em 4 mM de $K^+$ em músculo sartório isolado de rã	54
3.7.	Efeito da procaína (10 mM) na contratura induzida pelo perclorato (50 mM) em músculo sartório isolado de rã	57
3.8.	Efeito do eugenol na contratura induzida por concentrações crescentes de perclorato em preparações de músculo sartório isolado de rã mantidos em Ringer Normal	57
3.9.	Efeito da interação do íon perclorato (2 mM) e eugenol (0.1, 0.3, 1 e 3 mM) na contratura induzida por 40 mM de $K^+$ em músculo sartório isolado de rã	61
3.10.	Efeito do eugenol (1, 5 e 10 mM) ou cafeína (30 mM) na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina	61
3.11.	Efeito da procaína (10 mM) sobre as contraturas induzidas pelo eugenol (5 e 10 mM) ou cafeína (30 mM) em fibra permeabilizada com saponina	63
3.12.	Efeito do eugenol (5 mM) na relação força/ $[Ca^{2+}]$ em fibra permeabilizada com Triton X-100	66
3.13.	Efeito do eugenol (1, 5 e 10 mM) na força máxima induzida em fibra permeabilizada com Triton X-100	66

3.14.	Efeito do perclorato (9 e 36 mM) na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina	69
3.15.	Efeito da procaína (10 mM) na contratura induzida pelo perclorato (36 mM) em fibra permeabilizada com saponina	69
3.16.	Efeito do perclorato (10 mM) na relação força/[Ca <sup>2+</sup> ] em fibra permeabilizada com Triton X-100	72
3.17.	Efeito da interação do íon perclorato (9 mM) e eugenol (1 mM) na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina	72
4.	DISCUSSÃO	76
5.	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

AEC: acoplamento excitação-contração

ATP: trifosfato de adenosina

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

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

CICR: calcium-induce calcium release (cálcio induz a liberação de cálcio)

CP: fosfocreatina

DHPR: receptor dihidropiridínico

EGTA: ácido etileno bis (b-amino etil eter N, N, N',N' tetracético

eug.: eugenol

[H<sub>3</sub>] ry: rianodina tritiada

MMP: meromiosina pesada

MML: meromiosina leve

pCa: - log [Ca<sup>2+</sup>]

percl.: perclorato

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

proc.: procaína

ry: rianodina

RYR: receptor de rianodina

RS: retículo sarcoplasmático

Sol R: solução de relaxamento

Sol C: solução de carregamento

Sol L: solução para lavar a fibra para retirada da cafeína

Sol FM: solução para se obter a força máxima

TRIS: Tris-(hidroxymethyl)-aminomethane

8.5↑: pCa 8.5 contendo 5.0 mM de EGTA

8.5↓: pCa 8.5 contendo 0.5 mM de EGTA

[ ]<sub>e</sub>: concentração extracelular

[ ]<sub>i</sub>: concentração intracelular

## Lista de Figuras

- Figura 1- Representação esquemática de uma unidade motora com detalhes da junção 4 neuromuscular
- Figura 2- Representação esquemática de uma célula muscular esquelética e as respectivas 5 estruturas envolvidas no processo de acoplamento excitação-contração
- Figura 3- Desenho esquemático do mecanismo de contração muscular 7
- Figura 4- Modelo do ciclo das pontes transversas descrito por Hibberd & Trentham 11
- Figura 5- Efeito do eugenol (0,1; 0,3, 1,0 e 3,0 mM) na contratura induzida por 100 mM de 49  $K^+$  em músculo sartório isolado de rã.
- Figura 6- Efeito do eugenol (10 mM) em músculo sartório isolado de rã mantido em solução 50 extracelular contendo 4 ou 100 mM de  $K^+$ .
- Figura 7- Efeito do eugenol (3 mM) na contratura induzida por cafeína (2 mM) em músculo 52 sartório isolado de rã
- Figura 8- Efeito do perclorato (2 mM) na contratura induzida por 40, 80 e 100mM de  $K^+$  em 53 músculo sartório isolado de rã
- Figura 9- Efeito de concentrações crescentes de perclorato (0,1 à 150 mM) em músculo 55 sartório isolado de rã mantidos em solução contendo 4 ou 100 mM de  $K^+$
- Figura 10- Efeito da remoção do íon cálcio externo na contratura induzida pelo perclorato em 56 músculo sartório isolado de rã mantido em solução contendo 4 mM de  $K^+$ .
- Figura 11- Efeito da procaína (10 mM) na contratura induzida pelo perclorato (50 mM) em 58 músculo sartório isolado de rã
- Figura 12- Efeito do eugenol (1 mM) na contratura induzida por concentrações crescentes de 59- perclorato (0,1 à 150 mM) em músculo sartório isolado de rã mantidos em solução de Ringer 60 Normal (4 mM  $K^+$ )
- Figura 13- Efeito da interação do íon perclorato (2 mM) e eugenol (0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mM) na 62 contratura induzida por 40 mM de  $K^+$  em músculo sartório isolado de rã.
- Figura 14- Efeito do eugenol (1, 5 e 10 mM) e cafeína (30 mM) na liberação de cálcio do 64 retículo sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina
- Figura 15- Efeito da procaína (10 mM) na contratura induzida pelo eugenol (5 e 10 mM) ou 65 cafeína (30 mM) em fibra permeabilizada com saponina

Figura 16- Efeito do eugenol (5 mM) na relação força/[Ca<sup>++</sup>] em fibra permeabilizada com 67 Triton X-100

Figura 17- Efeito do eugenol (5 mM) na relação força/[Ca<sup>++</sup>] em fibra permeabilizada com 68 Triton X-100.

Figura 18- Efeito do perclorato (9 e 36 mM) na liberação de cálcio do retículo 70 sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina

Figura 19- Efeito da procaína (10 mM) na contratatura induzida pelo perclorato (36 mM) ou 71 cafeína em fibra permeabilizada com saponina

Figura 20- Efeito do perclorato (10 mM) na relação força/[Ca<sup>2+</sup>] em fibra permeabilizada com 74 Triton X-100.

Figura 21- Efeito da interação do íon perclorato (9 mM) e eugenol (1 mM) na liberação de 75 cálcio do retículo sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina

## Lista de tabelas

Tabela 1: Composição das soluções utilizadas em preparações com músculo sartório intacto (em mM). 45

Tabela 2: Composição das soluções (em mM), calculadas através do programa MS and BES (turbo-87 ver. 3.0), utilizadas para os protocolos experimentais realizados com fibra permeabilizada com saponina ou Triton X-100. 46

Tabela 3: Representa o volume das soluções com pCa 7.0 e com pCa 5.0 (em ml), calculadas através do programa GW-BASIC ver. 3.2 para o preparo das soluções de pCa intermediários necessárias para a realização dos protocolos utilizados quando as fibras foram permeabilizadas com Triton X-100. 47

## Resumo

Utilizando-se de músculo sartório intacto de rã e de fibras musculares quimicamente desmembranadas com o uso de saponina e Triton X-100, realizou-se um estudo dos efeitos do eugenol, perclorato isoladamente e em combinação no mecanismo de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e no sistema contrátil. Foi observado em músculo intacto que:

- 1) O eugenol em concentrações entre 1 – 3 mM foi capaz de bloquear a contração induzida por 100 mM de  $K^+$ . Quando utilizou-se alta concentração de eugenol (10 mM), este composto foi capaz de induzir contração por si só tanto em solução contendo 4 mM de  $K^+$  quanto em solução contendo 100 mM de  $K^+$ . O eugenol (3 mM) potencializou o efeito contraturante da cafeína (2 mM).
- 2) As contrações induzidas por 40, 80 e 100 mM de  $K^+$  foram potencializadas pelo perclorato (2 mM).
- 3) O efeito contraturante do perclorato (0,1 à 150 mM) só se manifestou quando o músculo foi mantido numa concentração extracelular de potássio de 4 mM. A remoção do cálcio externo, não alterou estas contrações. A procaina (10 mM) bloqueou a contração induzida por 50 mM de perclorato.

Em fibras permeabilizadas com saponina observou-se que:

- 1) O eugenol (1, 5 ou 10 mM) e o perclorato (9 ou 36 mM) induziram liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Estas contrações foram bloqueadas pela procaina. Não foi observado potencialização da contração induzida pela associação desses compostos.

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

- 1) O eugenol não alterou a sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio ou a força máxima das fibras.
- 2) O perclorato (10 mM) aumentou a sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio, mas não alterou a força máxima.

Esses dados sugerem que:

- 1) O eugenol atua em dois passos do processo de acoplamento-excitação contração: na

transdução do sinal entre os receptores DHP/RYR e induzindo a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático.

- 2) Em músculo intacto o efeito contraturante do perclorato é dependente do potencial de membrana.
- 3) Em músculo permeabilizado com saponina o perclorato atua liberando cálcio do retículo sarcoplasmático.

## Summary

The effects of eugenol and perchlorate isolated and in combination were investigated in intact sartorius muscle and in chemically skinned skeletal muscle fibers of the frog. In sartorius muscle, eugenol (0.1 - 3 mM) blocked the potassium ( $K^+$ )-induced contraction, but potentiated the responses induced by caffeine (1 mM). Perchlorate (2 mM) enhanced the  $K^+$ -induced contraction. Perchlorate induced muscle contraction only in preparations kept at 4 mM of potassium solution and in saponin skinned fibers. These effects were blocked by procaine. Eugenol (0.1 - 3 mM) blocked the  $K^+$ -induced contraction even in the presence of 2 mM of perchlorate. At 4 mM of external solution eugenol potentiated the contractions induced by perchlorate. At a high concentration (10 mM), eugenol induced contraction by itself. We have also observed that eugenol was able to induce calcium release in saponin-skinned fibers. This effect was blocked by procaine. Eugenol did not alter the calcium sensitivity or the maximal force in single muscle fibers permeabilized by Triton X-100. These data suggest that: (i) eugenol blocks the excitation-contraction coupling at a step before calcium release and (ii) induces calcium release from sarcoplasmic reticulum.

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade do músculo esquelético é controlada pelo SNC por meio da inervação motora (motoneurônio) das fibras musculares esqueléticas e depende de uma série de integrações para que seu papel seja exercido de modo coordenado (MOSS & HOFMANN, 1992).

O potencial de ação gerado no motoneurônio é transmitido até a região pré-sináptica, ocorrendo entrada de íons cálcio na membrana da região terminal do motoneurônio. A entrada de cálcio se dá através de canais voltagem dependentes, que têm sua condutância aumentada quando da chegada do potencial de ação no terminal nervoso (SCHNEIDER & CHANDLER, 1973). O aumento da concentração de cálcio no terminal do motoneurônio será responsável pela excitose das vesículas, as quais contém acetilcolina, mediador responsável pela transmissão neuromuscular. Na membrana da vesícula sináptica existe uma proteína que será responsável pelo ancoramento da vesícula à membrana pré-sináptica. Uma vez ocorrido esse ancoramento, dá-se a liberação do conteúdo intravesicular de acetilcolina na fenda sináptica, sendo que o referido neurotransmissor poderá se difundir para as regiões adjacentes, ser degradado pela acetilcolinesterase ou ainda, se ligar à receptores nicotínicos presentes na membrana da fibra muscular (pós-sináptica). Esse receptor para acetilcolina é uma proteína, que funciona como um canal operado por neurotransmissor. As estruturas envolvidas nestes fenômenos estão representadas esquematicamente na figura 1.

Com a ligação da acetilcolina a esse receptor, haverá aumento da condutância deste canal, permitindo que ocorra o influxo de sódio a favor do seu potencial eletroquímico. Como esse canal também conduz íons potássio, este íon tende a sair da célula muscular. Contudo, como o gradiente eletroquímico para o sódio é bem maior que para o potássio, a despolarização local ocorre como consequência do influxo do íon sódio. Isso dará origem ao potencial miniatura de

placa. Caso a quantidade de acetilcolina liberada seja suficiente para alcançar o limiar de voltagem dos canais de sódio voltagem-dependentes presentes na região da placa motora, gerar-se-á nesta região, através da despolarização, a ocorrência do potencial de ação. Esse potencial se propagará radialmente e longitudinalmente para toda a célula muscular, de forma não decremental (vide figura 1).

Como o sarcolema da célula muscular esquelética apresenta invaginações que se projetam perpendicularmente ao eixo longitudinal da fibra, esta frente de despolarização alcançará o interior da célula muscular. Estas especializações do sarcolema são designadas como túbulos transversos (TT) e constituem no seu conjunto o sistema tubular transverso (FRANZINI-ARMSTRONG, 1996). Na membrana deste sistema tubular existem proteínas que apresentam segmentos transmembrana, os quais são sensíveis à variação de potencial. Estas proteínas são chamadas de receptores dihidropiridínicos (DHPR), por apresentarem alta afinidade ao conjunto de drogas do grupo dihidropiridínico. Estes receptores estão acoplados a uma outra proteína localizada na membrana da cisterna terminal do RS (retículo sarcoplasmático), designada como receptor de rianodina (RYR), pelo fato de que a rianodina, um alcalóide extraído da planta *Ryana speciosa*, nativa de Trinidad e Tobago, ter alta afinidade por esta proteína (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997). Na figura 2 estão representadas de forma esquemática as estruturas responsáveis pela transdução do sinal elétrico da membrana do sistema tubular transverso ao retículo sarcoplasmático.

A despolarização da membrana do sistema tubular transverso é detectada pelos DHPR, os quais, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, alteram a condutância do RYR, fazendo com que esses sejam abertos. Como consequência, os íons cálcio que se encontram armazenados no interior da cisterna terminal do RS são liberados para o citoplasma da célula muscular. Esse mecanismo é definido como o processo de acoplamento excitação-contração

(AEC) (RIOS, *et al.*, 1991), o qual será melhor discutido na sessão 1.2 (FRANZINI-ARMSTRONG, 1996; EBASHI, 1991; CSERNOCH *et al.*, 1999). As estruturas que participam do processo de acoplamento excitação-contração estão representadas na figura 2.

Figura 1- Representação esquemática de uma unidade motora com detalhes da junção neuromuscular (vide descrição no texto). Fonte: WYNSBERGHE, D. V., NOBACK, C. R., CAROLA, R. (1995). *Human Anatomy & Physiology*. 3<sup>o</sup>ed., Mc Graw-Hill, Inc.

Os números da representação a qual mostra os detalhes da junção neuromuscular representam respectivamente: 1, propagação do potencial de ação no motoneurônio; 2, entrada de cálcio através dos canais de cálcio; 3, liberação de acetilcolina através das vesículas de acetilcolina; 4, entrada de íons sódio; 5, entrada de potássio através dos canais de potássio; 6, propagação do potencial de ação na fibra muscular; 7, degradação da acetilcolina através da acetilcolinesterase.

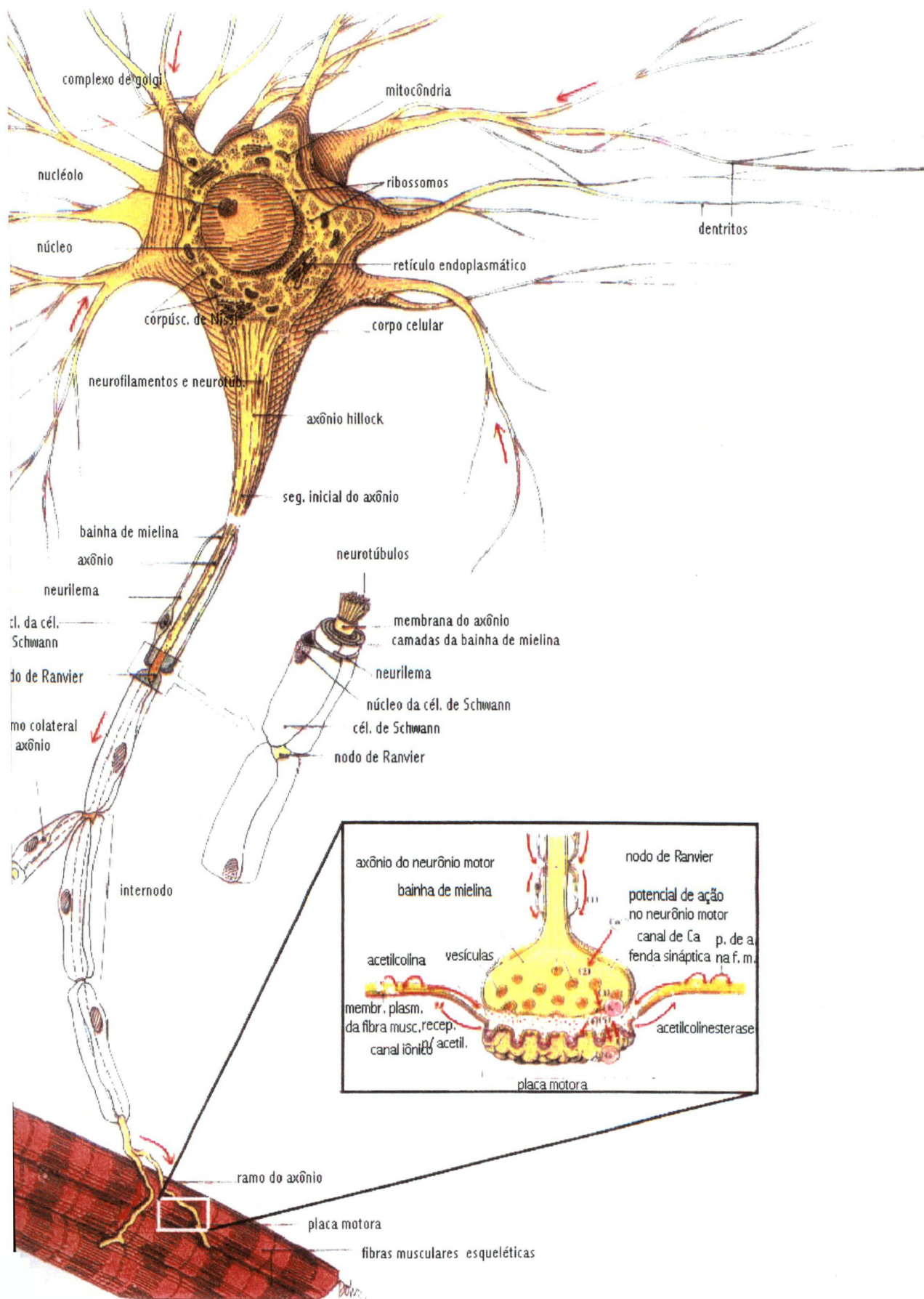
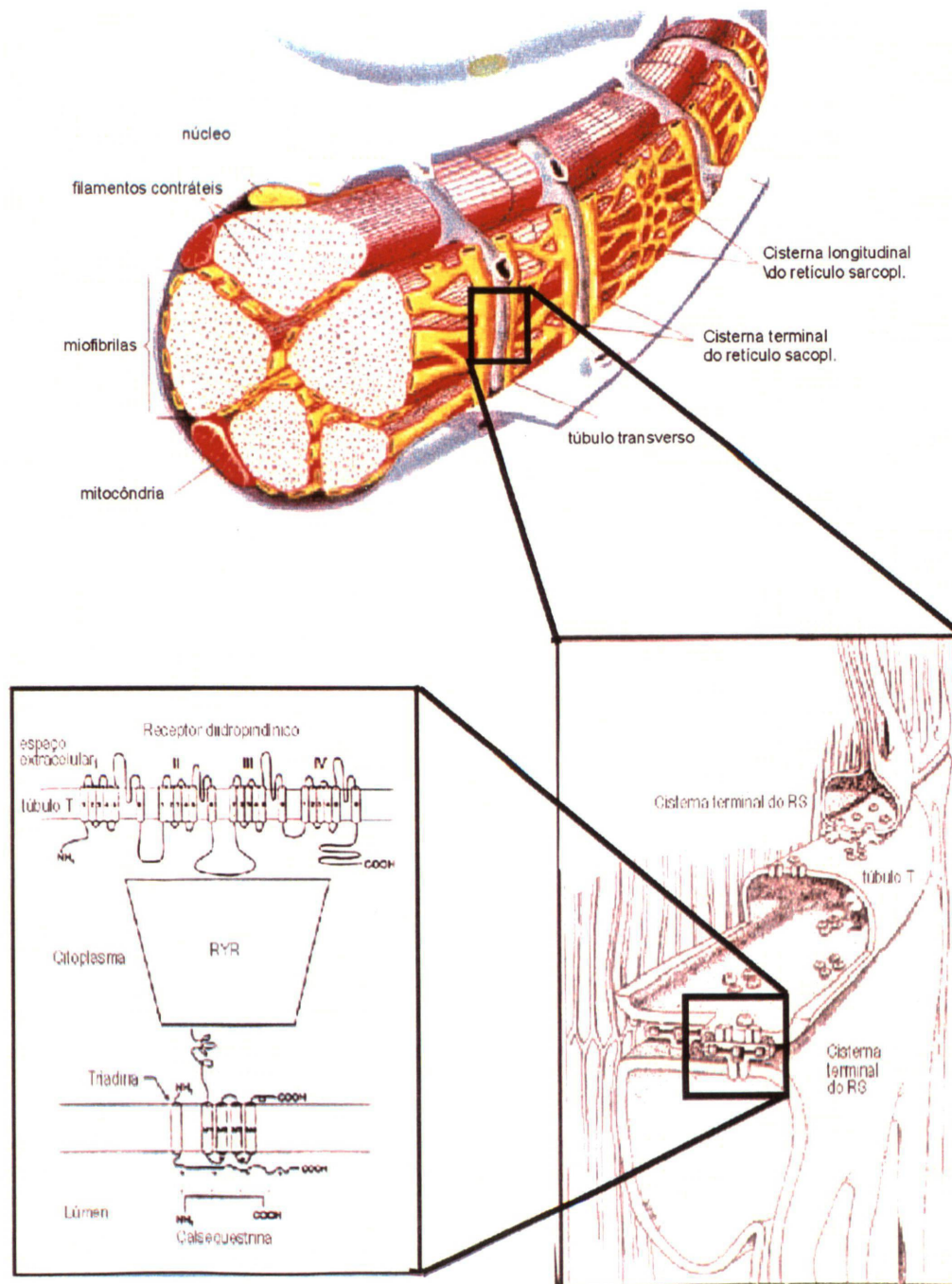


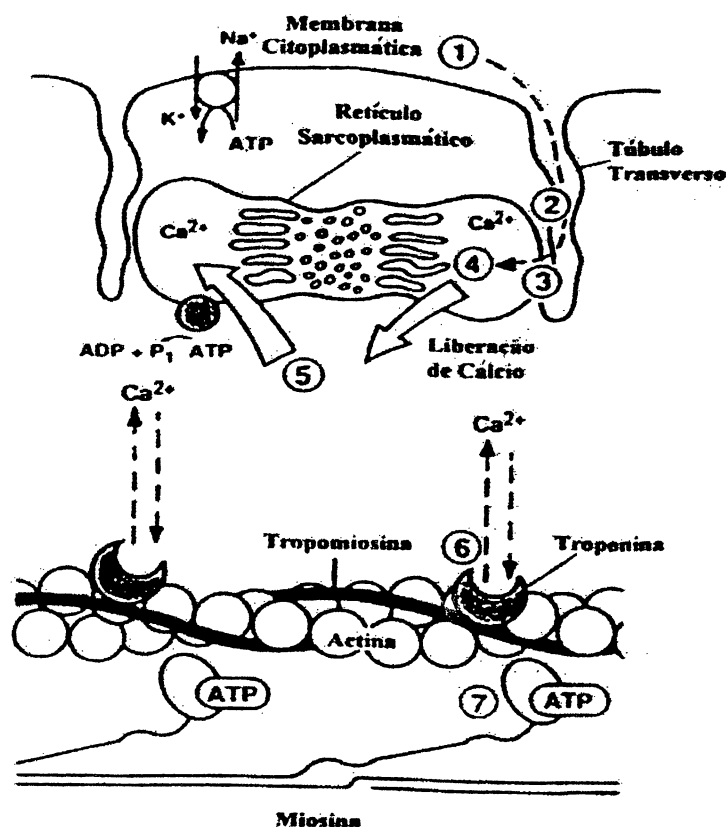
Figura 2- Representação esquemática de uma célula muscular esquelética e as respectivas estruturas envolvidas no processo de acoplamento excitação-contração (vide detalhes no texto).  
 Fonte: GARRETT & GRISHAM, 1995; RIOS & PIZARRO, 1991; GUO & CAMPBELL, 1995.



O cálcio liberado do RS dispara o fenômeno de contração muscular (WIER & YUE, 1986; ASHEY *et al.*, 1991; SIPIDO & WIER, 1991; WIER & BLETTER, 1991). No repouso, a concentração de cálcio no citoplasma da célula muscular esquelética é de cerca de  $10^{-7}$  M à  $10^{-8}$  M, aumentando para cerca de  $10^{-5}$  M quando o cálcio é liberado pelo RS (MOSS & HOFMANN, 1992).

Os íons cálcio ligam-se a sítios de baixa afinidade presentes na molécula de troponina C e promovem mudança conformacional do complexo troponina-tropomiosina, permitindo a exposição do sítio de ligação da actina à cabeça da miosina, e assim desencadeando o fenômeno contrátil (BRENNER, 1986; GOLDMAN & BRENNER, 1987; GUTH & POTTER, 1987; BRENNER, 1991; SHENG *et al.*, 1991; STRANG & POTTER, 1992;).

Figura 3- Desenho esquemático das etapas envolvidas no processo de contração muscular. Os números se referem aos sítios e mecanismos envolvidos no processo: 1, excitação da membrana plasmática; 2, despolarização do sistema tubular transverso; 3, acoplamento entre o sensor de voltagem no túbulo T e a liberação de íons cálcio do RS através dos canais de cálcio; 4, liberação de cálcio pelo RS; 5, recaptção de íons cálcio pelo RS; 6, ligação do cálcio a troponina; 7, ligação da miosina a actina, hidrólise do ATP, desenvolvimento de força pelas pontes transversas (FITTS & METZGER, 1988).



### 1.1. Proteínas que participam do mecanismo de contração muscular

Como descrito acima, para que ocorra a contração muscular é necessário a interação cíclica das pontes transversas da miosina com a actina. Cada uma destas proteínas que participam do mecanismo de contração muscular possuem propriedades e características específicas.

A miosina é a principal proteína que compõe o filamento grosso. Essa proteína é um dímero, com aproximadamente 500 kDa. Cada monômero desse dímero é formado por uma cadeia pesada e por uma cadeia leve. A cadeia leve é constituída por uma porção em bastão, denominada de meromiosina leve (MML). A cadeia pesada é composta por uma pequena porção em bastão ( $S_2$ ) e uma cabeça globular ( $S_1$ ) que liga a porção  $S_1$  à cadeia leve (SQUIRE, 1981; CHALOVICH, 1992; GORDON *et al.*, 2000).

Associadas a cabeça globular da miosina existem duas proteínas: a cadeia leve essencial e a cadeia leve regulatória, ambas possuem estrutura homóloga à troponina C e à calmodulina. A remoção da cadeia essencial faz com que a miosina perca sua atividade ATPásica (COOKE, 1997; GORDON *et al.*, 2000).

Na cabeça da miosina existem sítios de ligação para nucleotídeos, bem como um sítio de ligação para a actina. Dependendo das concentrações intracelulares de cálcio e do estado do nucleotídeo (ATP) que estaria ligado à cabeça da miosina, esta poderá variar sua posição de  $90^\circ$  para  $45^\circ$  (em relação à  $S_2$ ) (KALABOKIS *et al.*, 1994; GORDON *et al.*, 2000), mudança esta que promove a geração de força.

A interação da cabeça da miosina com a actina, em concentrações fisiológicas de cálcio, ocorrem em múltiplas etapas, em um ciclo conhecido como o ciclo das pontes transversas, o qual está representado na figura 4 (HIBBERD & TRENTHAM, 1986; MOSS & HOFMANN, 1992; GORDON *et al.*, 2000).

O filamento contrátil grosso, além da proteína contrátil miosina, seu principal componente, possui outras proteínas como a C, H, X, e titina, que desempenham papel importante na manutenção da organização da estrutura dos miofilamentos no sarcômero, e a proteína M que conecta os filamentos grossos no centro da banda A do sarcômero. Essas proteínas não tiveram suas funções ainda totalmente esclarecidas (WANG, 1996; GORDON *et al.*, 2000).

O filamento contrátil fino tem como principal componente a proteína globular actina, que possui aproximadamente 42 kDa. No músculo, a actina assume uma forma filamentosa, conhecida como actina F. Os filamentos de actina estão arranjados em dupla hélice, como uma torção das unidades a cada sete monômeros de actina, que se ancoram a uma estrutura denominada linha Z, graças a presença da proteína nebulina que se estende por todo o filamento fino (CHALOVICH, 1992; WANG, 1996).

O conjunto de miofilamentos grossos e finos presentes entre duas linhas Z constituem a unidade morfofuncional do músculo esquelético, denominada sarcômero (MOSS & HOFMANN, 1992). Esta estrutura de acordo com os dados obtidos por microscopia eletrônica permitiu dividir o sarcômero em bandas (HUXLEY & HANSON, 1954; HUXLEY, 1957). A banda A, assim chamada devido a anisotropia, é constituída por uma região onde se sobrepõem os filamentos grossos e finos e por uma região central do sarcômero, conhecida como zona H, onde existem somente filamentos finos. A banda I é dividida pela linha Z, a qual delimita o sarcômero.

Os filamentos finos também estão constituídos por uma proteína, a tropomiosina, que se localiza no sulco dos filamentos de actina e confere aos mesmos estabilidade (CHALOVICH, 1992; COOKE, 1997; GORDON *et al.*, 2000). A estequiometria da tropomiosina para a actina é de 1:7 (CHALOVICH, 1992).

Está também presente no filamento fino e associado à tropomiosina e à actina um complexo protéico, denominado troponina. A cada sete monômeros de actina existe um desses complexos. Este complexo é constituído por três subunidades. Uma que, por se ligar ao cálcio é chamada de troponina C, outra que por estar ligada a tropomiosina é chamada de troponina T e a terceira que por inibir a interação da actina com a miosina é descrita como troponina I (LEAVIS & GERGELY, 1984)

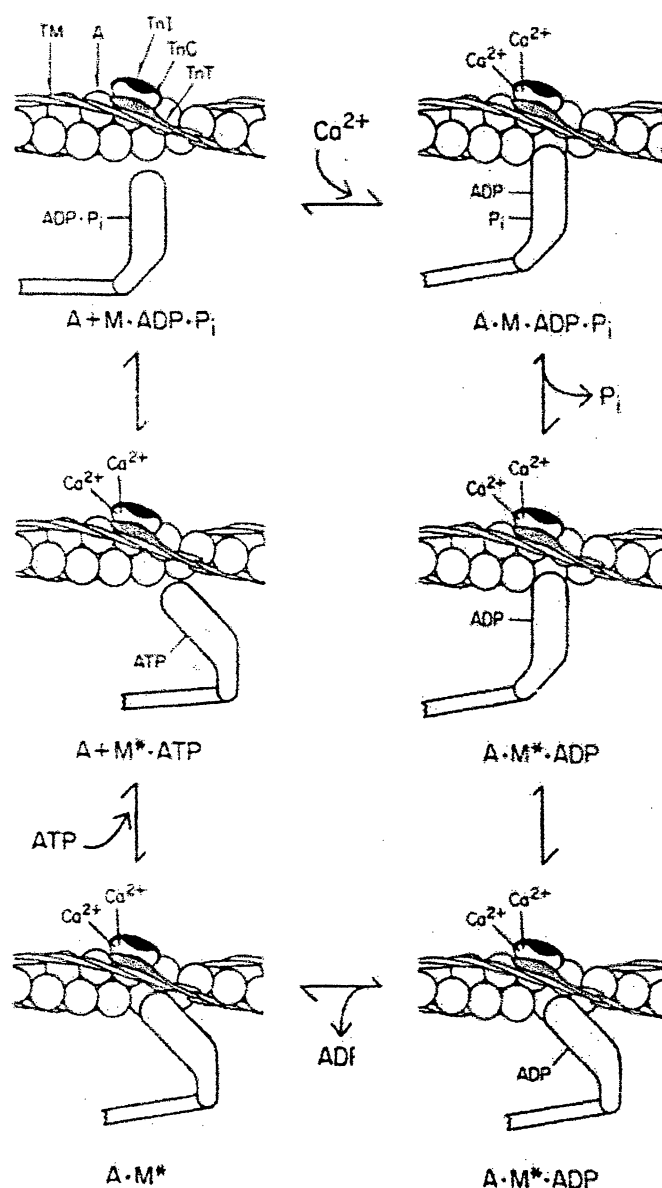
A troponina C tem dois sítios específicos de baixa afinidade ao cálcio. Esses sítios não são ocupados quando a concentração de cálcio mioplasmático é menor do que  $10^{-6.5}$  M. Sabe-se que com uma concentração de cálcio menor que  $10^{-7.0}$  M a tropomiosina assume uma posição no filamento fino que fisicamente bloqueia a ligação da miosina com a actina. No entanto, quando a concentração de cálcio se eleva para níveis de aproximadamente  $10^{-5.0}$  M, os sítios de baixa afinidade da troponina C são saturados com cálcio. Como consequência, a tropomiosina assume uma posição no filamento fino, que permite que a porção  $S_1$  da meromiosina pesada se ligue a actina, resultando na geração de tensão e/ou encurtamento do sarcômero (CHALOVICH, 1992; COOKE, 1997).

A interação cíclica das pontes transversas ocorre em várias etapas e nela se dá a transdução de energia química em mecânica. O modelo proposto por Huxley e outros pesquisadores (HUXLEY & HANSON, 1954; HUXLEY & NIEDERGERKE, 1954; HUXLEY, 1957; NAYLOR *et al.* 1985) assume que haveria um estado no qual a miosina estaria desligada da actina e que, com a formação do complexo actomiosina, resultaria na produção de força (RUEGG, 1988).

Assume-se hoje que a interação da actina com a miosina ocorre em diferentes etapas. Segundo (HIBBERD & TRENTAM, 1986), o ciclo das pontes transversas ocorreria em etapas, como discutido à seguir, apresentado na figura 4. As letras A e M representam a actina e a

miosina, respectivamente. O complexo actomiosina está representado por A.M e a formação do complexo miosina.ATP está representado como M.ATP, podendo encontrar este nucleotídeo na sua forma isomerizada, ADP.P<sub>i</sub>.

Figura 4- Modelo do ciclo das pontes transversas descrito por Hibberd & Trentham, 1986.



Quando a concentração intracelular de cálcio é de  $10^{-7}$  M, o músculo se encontra relaxado ( $A+M \cdot ADP \cdot P_i$ ) e a interação da actina com a miosina é inibida por proteínas regulatórias do

filamento fino, a tropomiosina e a troponina. A formação do complexo M.ADP.P<sub>i</sub> decorre da atividade ATPásica da cabeça da miosina, a qual é independente da presença de íons cálcio. Nesta fase, a região S<sub>1</sub> da miosina se encontra em um ângulo de 90° em relação a sua porção S<sub>2</sub>.

Na fase subsequente do ciclo inicia-se o movimento da cabeça da miosina (S<sub>1</sub>) em direção a actina. Isto ocorre quando a concentração de cálcio mioplasmático aumenta para níveis próximos de 10<sup>-5.0</sup> M, o que é suficiente para alterar a conformação do complexo troponina-tropomiosina, liberando os sítios ativo de ligação da cabeça da miosina existentes na actina, formando assim o complexo A.M.ADP.P<sub>i</sub>.

Como consequência da liberação do fosfato inorgânico (Pi) forma-se, à seguir, o complexo A.M.ADP.Pi e as pontes transversas desenvolvem força. Este último é conhecido como estado produtor de força. Nesta fase a cabeça da miosina está ligada a actina formando um ângulo de 45° em relação a cauda da miosina. Isso resulta no deslizamento do filamento fino sobre o filamento grosso em aproximadamente 10nm.

Com a consequente liberação do ADP do complexo A.M.ADP, forma-se o complexo A.M. Neste estado, a ligação da miosina com a actina é de forte ligação. Em condições fisiológicas, a concentração de ATP intracelular é suficiente para saturar os sítios de ligação de nucleotídeo da cabeça da miosina. Com a ligação do ATP à cabeça da miosina, o complexo actina-miosina rapidamente se desfaz, como consequência da redução da afinidade da cabeça da miosina à actina.

A atividade ATPásica da cabeça da miosina leva a formação do complexo M.ADP.P<sub>i</sub>, e se persistirem níveis intracelulares de cálcio suficientes para desinibir a interação da actina com a miosina, um novo ciclo reiniciará. Caso ocorra a remoção de cálcio do meio intracelular, a formação de estados de forte ligação da actina com a miosina (estados A.M.ADP.Pi e A.M.ADP) deixará de ocorrer e, conseqüentemente, o músculo relaxará (HIBBERD & TRENTHAM, 1986).

## 1.2. Acoplamento excitação-contração (AEC)

Conforme descrito acima, os níveis de cálcio intracelulares, juntamente com as proteínas regulatórias, são os responsáveis pelo controle da contratilidade das células musculares esqueléticas. Os mecanismos responsáveis pela homeostasia intracelular desse íon são complexos (FRANZINI-ARMSTRONG *et al.*, 1995; CSERNOCH *et al.*, 1999).

Sabe-se que o RS desempenha um papel preponderante neste sistema de controle. Esta organela armazena cálcio através de um sistema de bombeamento de cálcio presente na cisterna longitudinal e o libera através de canais de cálcio (RYR) presentes na membrana da cisterna terminal (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997).

A eficiência no controle do nível de cálcio intracelular manifesta-se por uma atividade coordenada de eventos da membrana citoplasmática e de receptores existentes na membrana do RS com os RYR (FLEISCHER & INUI, 1989; BERS & FILL, 1998).

Sabe-se que o mecanismo de AEC em músculo esquelético envolve a liberação de cálcio do RS, a qual é controlada pelo DHPR. O DHPR é uma proteína que funciona como um canal iônico e está localizada na membrana do túbulo T. Esse receptor funciona como um sensor de voltagem, sendo este o responsável pelo primeiro passo no mecanismo de AEC (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997).

Os DHPR são constituídos por cinco subunidades,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ . Destas subunidades a mais conhecida e mais estudada é a subunidade  $\alpha_1$ . Esta subunidade é constituída por quatro domínios, designados como I, II, III e IV, e cada um destes é formado por seis segmentos transmembrana,  $S_1$  à  $S_6$ . Vários estudos demonstram que o segmento transmembrana  $S_4$  de cada domínio constitui a parte da molécula que é sensível a variação de voltagem (CADWELL &

CASWELL, 1982; TANABE *et al.*, 1990; CALLAWAY *et al.*, 1994). Isto foi verificado através do estudo realizado com ratos portadores de anomalia genética muscular que apresentava ausência do DHPR. Nesse estudo realizou-se a injeção do DNA de DHPR, onde foi possível detectar nestes animais que a região entre a alça II e III da subunidade  $\alpha_1$  do DHPR de músculo esquelético é um importante determinante para o AEC (TANABE *et al.*, 1987; TANABE *et al.*, 1990).

O RYR é assim chamado pela alta afinidade que o receptor apresenta pela droga rianodina. A rianodina é um alcalóide neutro extraído do caule ou raiz de uma planta denominada *Ryana speciosa*, nativa de Trinidad Tobago. A rianodina possui diferentes efeitos, de acordo com a concentração utilizada. Em baixas concentrações ( $< 10\mu\text{M}$ ) ela provoca liberação de cálcio do RS e em altas concentrações ocorre o bloqueio da liberação de cálcio do RS (MEISSNER, 1991; FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997; SHOSHAN-BARMATZ & ASHELEY, 1998).

O RYR foi isolado pela primeira vez solubilizando-se a zona juncional do RS com CHAPS (um detergente não iônico) e usando [ $\text{H}_3$ ] rianodina como marcador seletivo. Utilizando-se desta técnica, foi possível caracterizar a molécula do RYR. O receptor da rianodina é uma grande molécula, de  $29 \times 29 \times 12 \text{nm}$ , constituída por quatro subunidades iguais, que estão associadas, conferindo a este complexo o aspecto de um “trevo de quatro folhas” (LAI *et al.*, 1987; INUI *et al.*, 1988; LAI *et al.*, 1988; FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997).

A respeito da molécula do RYR, os últimos estudos mostram que sua estrutura é formada por um grande terminal hidrofílico  $\text{NH}_2$  (amina) que constitui o domínio citoplasmático da molécula e um terminal  $\text{COOH}$  (carboxila) hidrofóbico que corresponde ao canal intramembrana (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997).

O RYR é um canal de cálcio encontrado na membrana do RS de músculo esquelético, cardíaco, nervoso e liso. Esse receptor apresenta diferentes isoformas, nos diferentes tipos de tecidos de vertebrados, invertebrados, drosófilas e crustáceos. As isoformas purificadas até o momento foram as RYR<sub>1</sub>, RYR<sub>2</sub> e RYR<sub>3</sub>. A isoforma RYR<sub>1</sub>, também chamada de isoforma  $\alpha$ , foi a primeira a ser identificada e é encontrada em músculo estriado esquelético, tecido nervoso (nas células de Purkinje no cerebelo) e em músculo liso (MARKS *et al.*, 1989). A isoforma RYR<sub>2</sub> é predominante no músculo cardíaco, tecido nervoso e em menor proporção em músculo liso (LAI *et al.*, 1992; FRANZINI-ARMSTRONG & JOGERSEN, 1994; LEDBETTER *et al.*, 1994; KUWAJIMA *et al.*, 1995). A isoforma RYR<sub>3</sub> é a que está em menor proporção em relação as outras duas isoformas, tanto no cérebro, quanto em músculo liso e esquelético. Não é encontrada em músculo cardíaco e é imunologicamente distinta de RYR<sub>1</sub> e RYR<sub>2</sub> (JUNAKAR & DULHUNTY, 1994).

Animais como anfíbios, pássaros, répteis, peixes e vertebrados, possuem duas isoformas de RYR, o RYR $\alpha$  que correspondem aos RYR<sub>1</sub> e os RYR $\beta$  que correspondem aos RYR<sub>3</sub>. As isoformas RYR<sub>1</sub> e RYR<sub>3</sub> estão presentes quase que em mesma quantidade no músculo esquelético, e se localizam na região da tríade da fibra muscular. Estas duas isoformas estão intercaladas na junção da tríade e uma pequena quantidade de RYR está localizada a curta distância da junção (túbuloT-RS) (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997; MURAYAMA *et al.*, 1998; HERRMANN-FRANK *et al.*, 1999).

Os RYR interagem com várias outras proteínas e com outros RYR que estão associados à zona juncional do RS (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997). Essas interações são importantes na regulação e na otimização da função de liberação de cálcio, que desempenham os RYR (BERS & FILL, 1998).

Atribuíram a este receptor o formato de pé, decorrente da estrutura dos domínios citoplasmáticos deste canal. Estes domínios formam provavelmente uma conexão direta com os receptores DHPR. Acredita-se que esta região seja de suma importância para o mecanismo de AEC (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997).

### 1.3. Teorias do AEC

A liberação de cálcio através da membrana do RS ocorre entre um espaço de 12-17nm na junção entre DHPR e RYR e é controlada por mudanças no potencial da membrana do túbulo T (DHPR). Todavia, esse mecanismo de comunicação entre membranas é ainda desconhecido (RIOS & PIZARRO, 1991).

Tentando-se explicar o mecanismo de AEC foram criadas várias teorias. Estudos sugeriram a existência de um mensageiro intercelular, o IP<sub>3</sub>, que se comportaria como um segundo mensageiro na junção do túbulo T com o RS (VERGARA *et al.*, 1985).

Inúmeros trabalhos demonstram que este composto pode estar envolvido na liberação de íons cálcio de estoques intracelulares de músculo liso e de outros tipos celulares (SOMLYO *et al.*, 1988; FINCH *et al.*, 1991; HAROOTUNIAN *et al.*, 1991; PERES *et al.*, 1991; ROJAS *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1993). Seu papel na liberação de íons cálcio do RS de células de músculo esquelético e cardíaco permanece, contudo, controverso (ASHELEY *et al.*, 1991).

Há, no entanto, estudos demonstrando evidências contra tal hipótese proposta (HIDALGO & JAIMOVICH, 1989). Uma delas é de que a liberação do IP<sub>3</sub> dependeria da concentração de cálcio mioplasmático (VERGARA *et al.*, 1985; MISIAEN *et al.*, 1992; VALDIVIA *et al.*, 1992). A atividade do IP<sub>3</sub> na liberação de cálcio do RS seria maior entre 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup> M de cálcio citoplasmático e nula com 10<sup>-8</sup> M de cálcio (HIDALGO & JAIMOVICH, 1989; ROJAS *et al.*,

1992). Além disso, a atividade liberadora de cálcio do IP<sub>3</sub>, dependeria do estado do sensor de voltagem (DHPR), o qual deveria se encontrar em estado inativado para ocorrer liberação de cálcio do RS (DONALDSON, 1989; para revisão ver RIOS & PIZARRO, 1991).

Outra possibilidade para se explicar o AEC é através do mecanismo de transmissão elétrica. Esse mecanismo propõe que exista uma transmissão elétrica através de um canal iônico presente no lúmen do túbulo transversal e RS ou por efeito direto no RYR, presente na membrana do RS. Acreditam que o potencial de membrana propagado pela membrana do túbulo-T seja transmitido ao RS promovendo a geração de um potencial de ação na membrana dessa organela (MATHIAS *et al.*, 1980). Contudo, estudos evidenciam que todos os íons, com exceção do cálcio, são extremamente permeáveis a membrana do RS, e como consequência deste fenômeno não haveria condições de geração de um potencial elétrico transmembrana dessa organela. Assim, não há possibilidade da onda de despolarização do sarcolema se propagar para a membrana do RS (MEISSNER, 1983). Diante disto é pouco provável que esse mecanismo venha operar no desencadeamento da liberação de íons cálcio do RS.

A alcalinização é uma outra possibilidade para se explicar o AEC. Estudos experimentais mostraram que um aumento no pH em 0,2 unidades determinava contração em fibras desmembranadas (SHOSHAN-BARMATZ *et al.*, 1981). Reforçando-se esta teoria, demonstrou-se que a acidificação bloquearia os canais de liberação de cálcio do RS. Por essas razões, uma alcalinização local foi considerada como um mecanismo de acoplamento entre o sistema tubular transversal e o RS (MA & CORONADO, 1988; MA, 1989). No entanto, esta teoria não é muito aceita (ENDO, 1985).

Uma outra investigação, realizada na tentativa de se desvendar o mecanismo de transmissão DHPR-RYR postula que ocorra uma oxidação dos grupos sulfidrilas na proteína de canal (RYR). Porém, essa possibilidade foi questionada quando se utilizaram agentes redutores

oxidantes, demonstrando existir inconsistência no envolvimento fisiológico de oxidantes sulfidrílicos como transmissores de sinal (BRUNDER *et al.*, 1988).

Uma outra possibilidade para se explicar os mecanismos envolvidos na liberação de cálcio do RS é que o cálcio induz a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (CICR) (ENDO, 1985). Este mecanismo foi demonstrado em fibras permeabilizadas (ENDO *et al.*, 1970; FORD & PODOLSKY, 1970), em vesículas isoladas e em canais de cálcio incorporados em bicamada lipídica (SMITH *et al.*, 1986). Todavia, o envolvimento do mecanismo de cálcio induzindo a liberação através do próprio cálcio para ativação fisiológica da contração do músculo esquelético não está totalmente elucidado e tem sido questionado (ENDO, 1985).

Tem sido relatado que esse mecanismo (CICR) opera em músculo cardíaco (FABIATO, 1983) e se constitui numa forma de amplificação do sinal, ou seja, uma pequena quantidade de cálcio entraria na célula cardíaca através dos canais lentos de cálcio e induziriam a liberação de uma quantidade maior de cálcio do RS. Tal mecanismo tem sido amplamente aceito na literatura (FABIATO, 1983; ENDO, 1985). Contudo, para o músculo esquelético esse mecanismo é controverso, pois a liberação de cálcio do RS independe da concentração de cálcio extracelular (SCHNEIDER, 1994; BERS & FILL, 1998). Da mesma forma, quando se utilizam bloqueadores de canais lentos de cálcio, como verapamil, nifedipina, entre outros, a liberação de cálcio do RS não é abolida (FILL & BEST, 1989; BEZANILLA, 2000). Em músculo esquelético de vertebrados os canais lentos de cálcio (DHPR), que são sensíveis a entrada de cálcio do meio externo, não são importantes para o AEC (BERS & FILL, 1998).

Entre as teorias para se explicar o AEC, a que mais se aceita atualmente é a possibilidade de haver um acoplamento mecânico dos DHPR e RYR (SCHNEIDER & CHANDLER, 1973). Nessa teoria acredita-se que o sinal elétrico seja detectado pelo DHPR, causando uma mudança conformacional nesta molécula, a qual é transmitida para o RYR, induzindo a liberação de cálcio

do retículo sarcoplasmático. Essa hipótese sugere que uma molécula carregada na membrana do túbulo T é mecanicamente ligada a um local do canal do RS através de uma longa protrusão. Acreditam que este mecanismo envolva um acoplamento instantâneo e que a mudança no fluxo de íons cálcio do RS ocorra tão rápido quanto o movimento de cargas transmembrana (RIOS & PIZARRO, 1991).

Uma outra teoria foi proposta por Marx, onde o mecanismo de acoplamento eletromecânico decorreria de uma ativação coordenada e simultânea dos RYR (BERS & FILL, 1998; MARXS *et al.*, 1998). Para que ocorra uma ativação mais efetiva e mais rápida dos RYR, esta teria que ser sincronizada, otimizando assim o processo de liberação de cálcio do RS. Esse mecanismo se contrapõe com a idéia de que cada receptor funcione independentemente. Acredita-se que este mecanismo seja também válido para músculo cardíaco, por haver menos DHPRs por RYR em células cardíacas, podendo se tornar essa ligação combinada, até mais crucial para músculo cardíaco do que para músculo esquelético (FABIATO, 1983).

Em apoio a essa hipótese, segundo Marx, uma proteína designada FKPB, em decorrência da afinidade por uma droga (FK506), teria um papel fundamental por coordenar a ligação simultânea do grupo de RYR ativados de forma cooperativa (BRILLANTES *et al.*, 1994).

#### 1.4. Drogas utilizadas para o estudo do mecanismo de acoplamento excitação contração

O mecanismo de captação e liberação de íons  $\text{Ca}^{+2}$  do retículo sarcoplasmático é modulado por muitos fatores intra e extracelulares, como o  $\text{Ca}^{+2}$ , ATP,  $\text{Mg}^{+2}$  e calmodulina (CORONADO *et al.*, 1994; MEISSNER, 1994) e pode ser estudado através da utilização de drogas, incluindo cafeína, anestésicos, óleos essenciais e íons que também modificam a atividade do canal de liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  do retículo sarcoplasmático (LEAL-CARDOSO *et al.*,

1988; LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994; ALBUQUERQUE *et al.*, 1995; LEAL-CARDOSO & FONTANELES., 1999; SHOSHAN-BARMATZ & ASHELEY, 1998). Essas drogas são utilizadas como ferramentas que provocam perturbação no processo de AEC, auxiliando a desvendar os mecanismos intrínsecos envolvidos neste processo.

A cafeína (1,3,7 trimetilxantina), um alcalóide que pode ser extraído do grão de café (HERRMANN-FRANK *et al.*, 1999), tem sido usada intensivamente nos estudos dos mecanismos envolvidos na liberação de íons  $\text{Ca}^{+2}$  do RS (ENDO, 1977; STEPHENSON, 1981; FABIATO, 1983; SORENSON *et al.*, 1986; MEISSNER & HENDERSON, 1987; PALADE, 1987). Essa droga é largamente utilizada para se estimar a quantidade de cálcio que está armazenada no RS, de acordo com a resposta da força gerada em função de sua presença (NOSEK *et al.*, 1997).

Em fibras musculares intactas foi observado que a liberação de cálcio induzida pela cafeína independe do cálcio externo, indicando que o influxo de cálcio não é necessário para promover uma contratura cafeínica (AXELSON *et al.*, 1958) e que a mesma não causa despolarização da membrana (LÜTTGAU & OETLIKER., 1968) e não altera o potencial de ação (SANDOW, 1965).

No entanto, estudos mais recentes (SZÜCS *et al.*, 1991) relatam que a cafeína causa uma pequena mudança no movimento de cargas intramembrana em potenciais mais negativos. Este aspecto foi reinvestigado por Rios (RIOS & PIZARRO, 1991) em experimentos onde o retículo sarcoplasmático encontrava-se depletado de cálcio, sendo induzido subsequentemente a uma contratura cafeínica. Nestas condições verificou-se que o movimento de cargas aumentou, tanto com a aplicação da cafeína antes da despolarização quanto com a aplicação da droga durante a despolarização. Diante desses dados, estes autores propõem que o cálcio liberado pela cafeína

interage diretamente com os sítios de ligação do sensor de voltagem (HERRMANN-FRANK *et al.*, 1999).

Em contrapartida, há evidências de que a cafeína atua a nível de canal de cálcio do RS (RYR). A partir disso, foi realizado um estudo para se investigar em que região deste canal (RYR) a cafeína estaria atuando. Para isto, foram utilizados fragmentos de RS onde se observou um aumento da liberação de íons cálcio na região da cisterna terminal do RS, mas não do sistema longitudinal. Esta observação pode ser explicada pelo fato de que a cisterna terminal do RS possui grande quantidade de RYR e a porção longitudinal apresenta carência destes canais. (WEBER & HERTZ, 1968).

Estudos recentes investigando-se substâncias fisiológicas, as quais a cafeína poderia estar atuando em conjunto, mostram que a interação da cafeína com dois ativadores fisiológicos, o cálcio e o ATP, aumentam a afinidade de ligação da ry pelo RYR, refletindo na abertura deste canal de cálcio (SARKOZI *et al.*, 1998). Neste estudo foi observado que a cafeína atua de maneira cooperativa tanto com o cálcio quanto com o ATP, indicando uma interação alostérica entre estes diferentes tipos de sítios de ligação, para o ATP e para o cálcio. Estes dados sugerem que a cafeína aumenta a sensibilidade do RYR por ativadores fisiológicos (ROUSSEAU *et al.*, 1988). Foi mostrado também que a cafeína por si só é capaz de ativar o RYR, na ausência de cálcio, porém este efeito só é verificado em concentrações de cafeína acima de 5 mM (HERRMANN-FRANK *et al.*, 1999).

Outra evidência mostrando que o sítio de atuação da cafeína é no RYR é através da análise do mecanismo de liberação de cálcio induzida pelo próprio cálcio (CICR), o qual acredita-se que seja o mecanismo que a cafeína atue. Para investigar o papel do mecanismo de cálcio induzindo a liberação do próprio cálcio (CICR) em músculo esquelético, tem sido mostrado que a cafeína é um potencializador da liberação de cálcio induzida pelo próprio cálcio

(ENDO, 1977; ENDO, 1985; SIMON *et al.*, 1989). Isto gera a hipótese de que a liberação de cálcio cause um aumento na concentração de cálcio liberado, produzido pelo mecanismo de cálcio que induz a liberação do próprio cálcio.

A cafeína também pode ajudar a detectar doenças como a hipertermia maligna, que no ser humano é caracterizada por contração muscular tônica, e hipertermia seguida de falência multissistêmica. Os músculos afetados nestes indivíduos são caracterizados por um aumento na sensibilidade de liberação de cálcio do RS pelo próprio cálcio, o qual seria induzido pela cafeína e/ou halotano (SHOSHAN-BARMATZ & ASHLEY, 1998).

A manifestação desta doença se dá quando o indivíduo recebe anestesia, onde são utilizados halotano e succinilcolina (TEGGAZIN *et al.*, 1996) e também o chlorocresol que é adicionado como conservante da succinilcolina (HERRMANN-FRANK *et al.*, 1996). Acreditam que indivíduos com hipertemia maligna possuam alteração molecular no RYR de pelo menos um domínio que está associado com um sítio regulatório de  $Ca^{+2}$  (SHOSHAN-BARMATZ & ASHLEY, 1998).

Para o tratamento da hipertemia maligna tem sido muito usado o “dantrolene”, um relaxante muscular que faz diminuir a liberação de  $Ca^{+2}$  do retículo sarcoplasmático, por interagir com regiões lipofílicas da proteína do RYR na membrana do RS, prevenindo a interação do halotano com o receptor de RYR (VAN WINKLE, 1976; LOPEZ *et al.*, 1987).

Assim como a cafeína, outros compostos químicos podem ser utilizados para se estudar o mecanismo de acoplamento excitação-contração, os quais podem fornecer importantes informações sobre os mecanismos que controlam a homeostase do íon  $Ca^{+2}$ .

Sabe-se que ânions inorgânicos como o tiocianato, iodato, perclorato e nitrato potencializam o AEC (RIOS & PIZARRO, 1991). Estes ânions possuem propriedades

caotrópicas (CAPUTO, 1983; MA *et al.*, 1993) que pode induzir a um enfraquecimento da interação entre proteínas e subunidades de proteínas (GONZALEZ & RÍOS, 1993).

O íon perclorato é um íon potencializador da contração muscular esquelética (CSERNOCH *et al.*, 1999). É um íon caotrópico que pode partir os grupos apolares dentro da molécula de água, desestabilizando as proteínas (FRUEN *et al.*, 1994a). Em vários estudos, o  $\text{ClO}_4^-$  demonstrou ser responsável por uma otimização do AEC em contraturas induzidas por potássio ou por estimulação elétrica (LÜTTGAU *et al.*, 1983; FELDMEYER & LÜTTGAU, 1988; FRUEN *et al.*, 1994a). Esse íon aumenta a permeabilidade do RS ao íon cálcio e produz uma maior eficiência no acoplamento entre os sensores de voltagem (DHP) e os RYR (CSERNOCH *et al.*, 1999). Esses efeitos do  $\text{ClO}_4^-$  não podem ser atribuídos à despolarização do sarcolema e provavelmente ocorre por mudanças funcionais e conformacionais no RYR (LÜTTGAU *et al.*, 1983).

Estudos relatam que o canal de liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  do RS (RYR) pode ser o sítio primário pelo qual o perclorato e outros ânions potencializadores afetam o AEC em músculos esqueléticos. Acredita-se que o Pi (fosfato inorgânico) poderia modular a atividade do RYR. Assim sendo, o Pi poderia ser considerado como um modulador endógeno deste canal (FRUEN *et al.*, 1994b). O Pi tem efeito no RYR em músculo esquelético, mas não tem efeito em músculo cardíaco. Seu efeito dependeria da ligação do mesmo com uma isoforma específica de RYR de músculo esquelético (FRUEN *et al.*, 1994b). Através destas observações, onde foi comparado o papel do perclorato com o Pi, foi gerada uma hipótese na qual se postula que o efeito do perclorato no DHPR (LÜTTGAU *et al.*, 1983; CSERNOCH *et al.*, 1987) parece ser dependente da interação fisiológica DHPR-RYR (RIOS *et al.*, 1991; MA *et al.*, 1993), sugerindo que a alteração na função do DHPR pode ser secundária ao efeito do perclorato na liberação de cálcio do RS. Estudos recentes

indicam que o perclorato pode ser uma ferramenta seletiva para se sondar a interação mecânica entre DHPR-RYR (CSERNOCH *et al.*, 1999).

O perclorato (2-20 mM) aplicado extra ou intracelularmente aumenta a tensão da fibra muscular e modifica a sensibilidade da ativação da contratilidade para potenciais mais negativos (GOMOLA *et al.*, 1983; HUANG, 1986; CSERNOCH *et al.*, 1987). Acredita-se que essas mudanças na dependência de voltagem do movimento de cargas e a ativação da contratilidade podem ser resultados da ação combinada em diferentes sítios (DHPRs e/ou RYR). Muitos estudos mostram que o perclorato atua em múltiplos sítios em músculo esquelético, o qual resulta na alteração do sensor de voltagem por transmissão alostérica (LÜTTGAU *et al.*, 1983; CSERNOCH *et al.*, 1987; RIOS *et al.*, 1992).

Outros trabalhos publicados também sustentam a idéia de uma interação alostérica entre os DHPR e os RYR (MA *et al.*, 1993; CSERNOCH *et al.*, 1999), onde se preconiza que o perclorato não é um simples agonista ou facilitador do sensor de voltagem, mas também um facilitador de transmissão do sinal entre o RYR e o DHPR. Isto faz pensar na possibilidade de que o perclorato tenha um efeito secundário no DHPR, em decorrência da transmissão do sinal proveniente do RYR para o DHPR. Uma explicação para este fato seria de que o perclorato poderia afetar a propagação da corrente de transmissão entre RYR/DHPR. Este mecanismo sugeriria que a transmissão do sinal é alostérica, pelo contato entre estes receptores (MA *et al.*, 1993; CSERNOCH *et al.*, 1999).

Esta interação alostérica entre DHPR-RYR não é de um para um, visto que estruturalmente a proporção destes receptores são distintas (RIOS *et al.*, 1993). Acreditam também que alguns RYRs permanecem fechados (abertura relutante) mesmo após a conexão com o DHPR ter mudado a conformação dos RYR. A presença do perclorato faz esta interação mais eficiente, e assim acreditam que o número de canais relutantes diminuem (MA *et al.*, 1993;

CSERNOCH *et al.*, 1999). Os diferentes efeitos das ferramentas farmacológicas utilizadas para se estudar o mecanismo de AEC em músculo esquelético podem refletir as diferenças estruturais existentes no DHPR, o qual é constituído por uma região sensível à voltagem e um canal lento de cálcio (RIOS & PIZARRO, 1991). Com a despolarização do sarcolema, uma fração de moléculas sensíveis à voltagem são convertidas de um estado inativo para um estado ativado. Acredita-se que o perclorato em músculo de sapo atue aumentando a fração de moléculas sensíveis a voltagem que são convertidas para o estado ativo durante a despolarização (LÜTTGAU *et al.*, 1983; HUANG, 1986; CSERNOCH *et al.*, 1987).

Em estudos realizados com fibra isolada e com músculo intacto de anfíbio mostrou-se ainda que o efeito do perclorato independe da entrada de cálcio através dos canais lentos de cálcio (DHPR), sugerindo que o efeito do perclorato não é decorrente do aumento do influxo de cálcio (FELDMEYER & LÜTTGAU, 1988; RIOS & PIZARRO, 1991).

Em um estudo com tríade (junção das membranas do sistema tubular transversal e das membranas da cisterna terminal do RS adjacentes), foi realizada a monitoração da mudança conformacional dos RYRs (YANO *et al.*, 1995), mostrando que quando se utilizavam baixas concentrações de perclorato ( $\leq 10$  mM), o mesmo era capaz de liberar cálcio do retículo sarcoplasmático somente quando o túbulo T estava quimicamente despolarizado. Ainda, que o perclorato em concentrações entre 30-100 mM produzia ativação significativa na liberação de cálcio do RS, independentemente da despolarização ou não do túbulo T (RIOS *et al.*, 1991; YANO *et al.*, 1995). Estes dados sugerem que o perclorato ativa o AEC em dois passos: em baixas concentrações ( $\leq 10$  mM) atua na transmissão do sinal entre o túbulo T e o RS, por potencializar a mudança conformacional no DHPR induzida pela despolarização do túbulo T, promovendo assim a liberação de cálcio do RS; em altas concentrações (30-100 mM) produz uma

mudança conformacional no RYR liberando cálcio do RS, independente se o túbulo T estiver despolarizado ou não (YANO *et al.*, 1995).

Neste mesmo estudo, utilizando-se de um bloqueador de DHPR, a nimodipina, verificou-se que quando o perclorato era aplicado em baixas concentrações, a nimodipina bloqueava os DHPRs, porém quando se utilizou altas concentrações de perclorato o efeito bloqueador da nimodipina não era observado (YANO *et al.*, 1995). Em altas concentrações de perclorato observou-se aumento da afinidade da ry pelo RYR, enquanto que em baixas concentrações o perclorato não teve nenhum efeito (GONZÁLEZ & RÍOS, 1993). Diante destes dados, sugere-se que o efeito do perclorato na ativação do RYR ocorre depois do DHPR detectar a alteração na voltagem. Porém, não se pode excluir a possibilidade alternativa de que a despolarização possa induzir a uma mudança conformacional no RYR, e que pode aumentar a afinidade do RYR pelo perclorato, permitindo que o perclorato atue no RYR em altas concentrações (YANO *et al.*, 1995).

A procaína é um anestésico local que bloqueia canais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  em preparações nervosas e musculares, em concentrações entre 1-40 mM (HILLE, 1992 ; KLEIN *et al.*, 1992).

Tem sido demonstrado que a procaína é um potente inibidor dos efeitos da cafeína na liberação de íons cálcio de músculo intacto (FEINSTEIN, 1963; THORENS & ENDO, 1975), em vesículas isoladas do RS (MORI & TONOMURA, 1983) e em fibras permeabilizadas (ENDO, 1985), possivelmente pela inibição do mecanismo de cálcio que induz a liberação do próprio cálcio (CICR) (ENDO, 1985). A procaína elimina a contínua liberação de cálcio do RS induzida pela cafeína mesmo depois da repolarização do sarcolema (ENDO, 1977; KLEIN *et al.*, 1992). A explicação para este efeito da procaína é que se a procaína bloqueasse não especificamente alguma fração dos canais de cálcio do RS ativados pela cafeína, esperaríamos observar efeitos da cafeína nas concentrações de cálcio após a despolarização. A eliminação destes efeitos da cafeína

indica uma inibição específica pela procaína do mecanismo CICR induzido pela cafeína (KLEIN *et al.*, 1992).

Estudos mostram que a ação da procaína (1 mM) não ocorre à nível de sensor de voltagem, mas sim num passo subsequente do processo de AEC, agindo no mecanismo de acoplamento entre a despolarização da membrana e a liberação de cálcio do RS ou apenas na liberação de cálcio do RS (KLEIN *et al.*, 1992). O cálcio armazenado no RS não é afetado pela procaína (KLEIN *et al.*, 1990).

Acredita-se que a procaína, e outros anestésicos, interagem com um sítio específico localizado no RYR e afeta as ligações com a ry e a atividade do canal (SHOSHAN-BARMATZ & ZCHUT, 1993; MARTIN *et al.*, 1993; XU *et al.*, 1993). Verificaram que ao ser adicionado procaína no citoplasma ou no RS reduzia a atividade do canal de liberação de cálcio (RYR) (XU *et al.*, 1993).

Para entender a relação existente entre a ação dos anestésicos locais e os RYR, foi construído um modelo para caracterizar o sítio de interação entre o RYR e o anestésico local (SHOSHAN-BARMATZ & ZCHUT, 1993). Este modelo postula a existência de uma proteína do RYR onde se liga a parte hidrofóbica dos anestésicos locais a sítios negativos e positivos desta proteína, o que implicaria na redução ou até abolição da atividade do canal (SHOSHAN-BARMATZ & ASHELEY, 1998).

Além desse efeito específico da procaína no RYR, acredita-se que anestésicos locais como a benzocaína, tetracaína, dibucaína e a procaína tenham um efeito direto no transporte de cálcio pela bomba de cálcio encontrada no RS (CaATPase), a qual é responsável pelo influxo de cálcio para o RS (WOLOSKER *et al.*, 1992). A CaATPase do RS é uma proteína ligadora de membrana que é responsável por ativar a recaptção de cálcio do RS durante o relaxamento muscular. Durante a entrada de cálcio, a enzima é fosforilada pelo ATP e gera-se um gradiente de

cálcio através da membrana. No processo de liberação de cálcio do RS a ATPase é fosforilada pelo Pi e a energia derivada do gradiente de cálcio é usada pela ATPase para sintetizar ATP do ADP e Pi. Acredita-se que estes anestésicos locais inibam a fosforilação da ATPase pelo Pi de maneira competitiva (WOLOSKER *et al.*, 1992). Esse efeito pode ser atribuído à ligação dos anestésicos locais aos fosfolipídeos da membrana e a mudanças na interface da proteína lipídica (WOLOSKER *et al.*, 1992).

O eugenol, um constituinte do óleo essencial extraído da planta de espécie *Eugenia caryophyllata*, possui um agradável aroma de cravo da Índia. É utilizado na indústria, cuja casca se extraem agentes utilizados para perfumes e, como aroma, para comidas e bebidas (CRAVEIRO *et al.*, 1977). É utilizado em odontologia como anestésico (FRISCH & BHASKAR, 1968).

O eugenol é um dos numerosos óleos voláteis que está presente em uma grande quantidade de óleos essenciais presentes em plantas. Óleos essenciais são produtos de princípios voláteis, de composição complexa, extraídos de plantas e modificados durante o processo de preparação (BRUNETON, 1995).

Grande parte destas plantas são encontradas no nordeste do Brasil, principalmente na região de vegetação de caatinga. O método de extração desses óleos para estudos farmacológicos é através da destilação. O eugenol, assim como outros óleos essenciais extraídos de plantas, possui larga gama de efeitos em seres vivos (COTMORE *et al.*, 1979). São utilizados como ferramentas para o estudo farmacológico em músculo liso, em processos inflamatórios, atividade antimicrobial (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*, bacilos, etc), em tecido nervoso e para estudar o mecanismo de acoplamento excitação-contração em músculo estriado esquelético (ALBUQUERQUE *et al.*, 1984; LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994; FOGAÇA *et al.*, 1997; LEAL-CARDOSO & FONTANELES, 1999). Interfere com as funções nervosas periféricas (ENDO *et*

*al.*, 1972), central (DALLMEIER & CARLINI, 1981) e junção neuromuscular (OZEKI, 1975; BRODIN & ROED, 1984a; BRODIN & ROED, 1984b).

O grupo de plantas de onde são extraídos os óleos essenciais, encontradas no nordeste brasileiro, em especial no Ceará, são divididas em várias classes. Um grupo de óleos, importante para o estudo do mecanismo de acoplamento excitação-contração de músculo esquelético é o óleo essencial derivado da planta de espécie *Croton zehntneri* (EOCZ) que possui como seus principais constituintes o estragol (59%) e o anetol (27%) (CRAVEIRO *et al.*, 1977). Outra espécie de planta de onde se extrai um óleo essencial utilizado para este estudo é derivado da *Mentha x villosa* (EOMV), denominado de óxido de piperitenona, que possui semelhanças com o efeito do eugenol em músculo esquelético (FOGAÇA *et al.*, 1997).

Os óleos essenciais derivados das espécies EOCZ (anetol e estragol) e EOMV (óxido de piperitenona) causam bloqueio do AEC em músculo esquelético em concentrações entre 0,3-3,0 mM, por um mecanismo não totalmente elucidado. Em concentrações entre 3,0-24 mM eles induzem contração, provavelmente pela liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, como determinado em preparações de músculo intacto por evidências indiretas e diretas através de experimentos realizados com fibra desmembranada (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995; FOGAÇA *et al.*, 1997).

Os efeitos de muitos óleos essenciais em parasitas e micróbios, processo inflamatório e sistema nervoso têm sido amplamente estudado (BORBA *et al.*, 1990; MENEZES *et al.*, 1990; RAO *et al.*, 1990; MAIA *et al.*, 1992; SANTANA *et al.*, 1992; SILVA & RAO, 1992; ALMEIDA & BARBOSA-FILHO, 1994; LIMA *et al.*, 1994). Entretanto, poucos dados existem sobre a ação destes óleos em músculo esquelético. Recentes estudos mostram que óleos essenciais como o eugenol e o óxido de piperitenona (EOMV) têm importantes ações em

músculo sartório, isto é, bloqueador do AEC e indutor de contração, dependendo da concentração utilizada (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994; FOGAÇA *et al.*, 1997).

Os efeitos do óxido de piperitenona em músculo esquelético é dependente da concentração. Em baixas concentrações (1-100µg/ml) não modifica o tônus muscular por si só, mas bloqueia a contratura potássica. No entanto, em altas concentrações (1-6mg/ml) induz contração. Este estudo mostra que a contratura induzida pelo óxido de piperitenona seja decorrente da liberação da cálcio do RS. Tal hipótese se baseia em primeiro lugar porque o óxido de piperitenona induziu somente uma pequena despolarização da membrana, insuficiente para ativar a contração. Em segundo lugar, porque as contrações induzidas pelo óxido de piperitenona foram inibidas pela procaína (10 mM), que atua inibindo a liberação da cálcio do RS e não tem ação direta na maquinaria contrátil (ENDO, 1977). Este estudo realizado com o óxido de piperitenona nos fornece importantes dados para sustentar as hipóteses propostas para o mecanismo de ação do eugenol no processo de AEC, visto que ambos apresentam vários efeitos semelhantes, sugerindo que atuem por mecanismos parecidos (FOGAÇA *et al.*, 1997).

Estudo mostra que o eugenol em altas concentrações (3,8-12 mM) induz contratura, e em baixas concentrações (0,1 e 2,5 mM) bloqueia a contratura potássica (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994). Em outros estudos, o eugenol tem mostrado inibir a transmissão neuromuscular em ratos, em concentração de 0,65 mM (BRODIN & ROED, 1984a ; BRODIN & ROED, 1984b) e 0,6 mM (OZEKI, 1975). Isto sugere que a potência do eugenol em bloquear o AEC em músculo esquelético é similar com a potência em bloquear a excitabilidade nervosa e a transmissão neuromuscular.

A contratura induzida pelo eugenol é similar àquela induzida pela cafeína (WEBER & HERZ, 1968), timol (SAKAI *et al.*, 1967), anetol e estragol (ALBUQUERQUE *et al.*, 1984;

LEAL-CARDOSO & ALBUQUERQUE, 1987). Este efeito demonstrou-se independente da presença de  $\text{Ca}^{+2}$  no meio extracelular e da ativação direta do sistema contrátil, e é potencializado pela presença de outros cátions divalentes no meio externo (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994).

Acredita-se que o bloqueio da contratura potássica, produzida quando da utilização de baixas concentrações de eugenol (0,1 e 2,5 mM), não pode ser atribuída a uma queda na despolarização produzida pelo potássio. Isto provavelmente pode ocorrer por um bloqueio na liberação de cálcio do RS. No entanto, a concentração similar de eugenol necessária para o bloqueio da contratura potássica potencializa a contratura cafeínica. Com isso, supõe-se que o efeito adicional do eugenol na contratura potássica provavelmente decorra de uma interferência em outros passos do acoplamento excitação-contração (RIOS & PIZARRO, 1991). Isso pode ser no passo sensível à voltagem ou na transmissão entre o passo sensível à voltagem (DHPR) e a liberação de cálcio do RS (RYR) (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994).

As semelhanças entre o eugenol, o óxido de piperitenona e outros óleos essenciais indicam que estas substâncias possuem constituintes químicos com alta atividade e potência sobre o mecanismo de AEC, sendo necessário mais estudos para esclarecer melhor o efeito destas drogas.

### 1.5. Objetivos

- 1) Investigar o processo de acoplamento excitação-contração, empregando substâncias que interferem com o mesmo;
- 2) Elucidar as ações do perclorato isolada e em combinação com o eugenol no processo de acoplamento excitação-contração em fibras musculares intactas;
- 3) Elucidar as interações destes dois compostos ao nível subcelular (retículo sarcoplasmático e sistema contrátil) empregando-se a técnica de fibra permeabilizada com saponina ou Triton X-100.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção e sacrifício dos animais

Neste estudo empregou-se músculo sartório proveniente de *Rana catesbiana* (rã) de ambos os sexos, pesando de 100 a 200g, fornecida por um criador local, mantidos no ranário do biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, e alimentadas *ad libitum*. O sacrifício do animal foi realizado através da descerebração, sendo em seguida realizada a dissecação do músculo sartório. Durante a dissecação, o músculo foi constantemente umedecido com solução de Ringer batráquio modificado, com a seguinte composição (em mM): NaCl 142.5, KCl 4.0, CaCl<sub>2</sub> 1.8, Hepes 10 (tamponado com HCL), MgCl<sub>2</sub> 1.8, Glucose 10, pH 7.4, à temperatura ambiente. Todos os experimentos foram realizados no laboratório de Fisiologia da Contração Muscular do Departamento de Fisiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, entre os meses de abril de 1999 à abril de 2000.

### 2.2. Músculo intacto de anfíbio

O animal foi sacrificado e o músculo sartório foi dissecado como descrito acima. O músculo foi mantido em uma câmara cilíndrica de 15ml contendo solução de Ringer (vide tabela 1) aerada, mantida em temperatura ambiente e pH 7.4. Para o registro de contrações isotônicas o músculo teve uma de suas extremidades fixada ao fundo da câmara e a outra conectada a uma alavanca para o registro em um quimógrafo (ZimMermann Leipzig – série 1878). A amplificação do registro em papel foi de 2.5 vezes. No início de cada protocolo foi permitido ao músculo equilibrar-se durante 20 minutos em solução de Ringer.

O músculo foi submetido aos diferentes protocolos experimentais através do enchimento direto da câmara pela extremidade superior, sendo a mesma esvaziada através de um sistema de esgotamento localizado em sua base. Fez-se a medida do comprimento do músculo em cada condição experimental.

### 2.2.1. Experimentos realizados com eugenol em músculo sartório intacto de anfíbio

O encurtamento muscular obtido em diferentes condições experimentais foram normalizados para aqueles induzidos por 100 mM  $K^+$ .

Em uma série de experimentos avaliamos o efeito do eugenol (0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mM) na contratura induzida por 100 mM de  $K^+$ . Para tal substituiu-se a solução contendo 4 mM de  $K^+$  por 100 mM de  $K^+$ . Após a contratura potássica ter alcançado o estado estacionário o músculo foi relaxado em solução de Ringer Normal (vide tabela 1). Nas condições controle, o intervalo de tempo entre estas contraturas foi suficiente para que a preparação respondesse com uma variabilidade de amplitude de encurtamento de no máximo 20%. Com o objetivo de avaliar a relação temporal do efeito do eugenol ou de outros procedimentos experimentais, avaliou-se o tempo necessário para que esse efeito se mantivesse estável. Através desta avaliação verificamos que 15 minutos de incubação das preparações com o eugenol foi suficiente para obtenção de seu efeito máximo. Para avaliação do tempo necessário para reversibilidade dos efeitos do eugenol induziu-se a contração das preparações com 100 mM de  $K^+$ , em intervalos de tempo variável após a última exposição ao mesmo. Manteve-se um intervalo de tempo entre as contraturas induzidas por 100 mM de  $K^+$  de no mínimo 15 minutos.

Avaliou-se também, o efeito do eugenol (10 mM), em preparações mantidas em solução externa contendo 4 ou 100 mM de  $K^+$ . Para tal, após terem sido feitas contraturas potássicas (100

mM), adicionou-se o eugenol na solução contendo 4 mM de  $K^+$ . Nos experimentos realizados com solução contendo 100 mM de  $K^+$ , fizeram-se inicialmente as contraturas potássicas e à seguir mantiveram-se as preparações nesta solução por um tempo necessário à obtenção de seu relaxamento. O eugenol foi então adicionado a esta solução e após ter sido obtido o estado estacionário, as preparações foram mantidas em Ringer Normal na ausência deste composto. Assim, após um dado intervalo de tempo submeteu-se, quando possível, as preparações a uma nova contratura induzida por 100 mM de  $K^+$ .

Para se avaliar o efeito do eugenol (3 mM) na contratura induzida por cafeína (2 mM) foi realizado primeiramente a indução de uma contratura por  $K^+$  (100 mM), para servir como controle, sendo em seguida obtido o seu relaxamento quando colocado em solução de Ringer Normal. Em seguida foi acrescentado cafeína (2 mM) à solução de Ringer Normal. Após se ter obtido resposta com a cafeína, o músculo foi mantido em solução de Ringer Normal por um período de no mínimo 30 minutos. Procedeu-se a cada dois minutos a substituição da solução da câmara com a finalidade de se remover a cafeína. Após este período adicionou-se o eugenol (3 mM) e manteve-se o músculo incubado com este composto por 15 minutos. À seguir adicionou-se a esta solução cafeína (2 mM). Após obtenção do platô da contração, as preparações foram mantidas em Ringer Normal na ausência destes compostos por um período de tempo de pelo menos 30 minutos. Uma contratura potássica (100 mM) foi realizada após a preparação ter sido lavada diversas vezes.

#### 2.2.2. Experimentos realizados com perclorato em músculo sartório intacto de anfíbio

Com objetivo de se avaliar o efeito do perclorato (2 mM) na contratura induzida por potássio, foram realizadas três contraturas consecutivas por  $K^+$  (40, 80 e 100 mM,

respectivamente). Em seguida, foram induzidas as três contraturas potássicas (40, 80, 100 mM) na presença de perclorato (2 mM). Fez-se a seguir o controle posterior submetendo as preparações novamente a contratura com 40, 80 e 100 mM de  $K^+$  na ausência de perclorato.

Em uma série de experimentos avaliou-se o efeito de concentrações crescentes de perclorato (0,1 à 150 mM) em músculos mantidos em solução nutritora contendo 4 mM de  $K^+$ . Realizaram-se contrações induzidas com 100 mM de  $K^+$  e à seguir, mantendo-se as preparações em 4 mM de  $K^+$  fez-se a adição de perclorato na solução nutritora, o suficiente para a obtenção de concentrações finais deste ânion de 0,1 à 150 mM.

Empregando-se protocolo idêntico ao descrito acima, avaliou-se o efeito da remoção do  $Ca^{2+}$  extracelular na contratura induzida pelo perclorato. Para tal, após a contratura induzida com 100 mM  $K^+$ , o músculo foi mantido em solução nutritora na qual não foi adicionado o íon  $Ca^{2+}$  e tendo-se acrescentado a mesma 1 mM de EGTA, com o objetivo de reduzir a concentração extracelular deste íon.

### 2.2.3. Experimentos realizados com perclorato e eugenol em músculo sartório intacto de anfíbio

Após se ter testado o efeito do perclorato (2 mM) na contratura induzida por concentrações crescentes de  $K^+$ , avaliou-se a interação do íon perclorato e do eugenol (0,1; 0,3, 1,0 e 3 mM) em contrações promovidas por 40 mM de  $K^+$ . Fez-se inicialmente uma contratura com 40 mM de  $K^+$  e após o relaxamento obtido com Ringer Normal, adicionou-se a esta solução 2 mM de perclorato. À seguir fez-se a contratura com 40 mM de  $K^+$ , mantendo-se nesta solução 2 mM de perclorato. Novamente o músculo foi relaxado em solução de Ringer Normal mas mantendo-se 2 mM de perclorato e adicionando-se quantidades desejadas de eugenol. O período de incubação com o perclorato e eugenol foi de 15 minutos.

Como a contratatura induzida pelo perclorato manteve-se por longo tempo, os experimentos foram realizados em um músculo e empregou-se o músculo contra lateral para se avaliar os efeitos da associação deste ânion com o eugenol. Após a montagem da preparação conforme descrito acima, permitiu-se inicialmente que o músculo se equilibrasse à solução de Ringer Normal por 15 minutos. Após a contratatura induzida por 100 mM de  $K^+$  o músculo foi relaxado em solução de Ringer Normal (4 mM  $K^+$ ). Realizou-se à adição de perclorato (0,1 à 150 mM) diretamente na câmara até obter-se a concentração final desejada. O intervalo de tempo entre as diferentes concentrações de perclorato foi suficiente para se obter o estado estacionário. Nos experimentos onde avaliou-se o efeito da interação do perclorato e eugenol, este último foi adicionado diretamente à câmara 15 minutos antes de se iniciar a adição de perclorato. Ao final de cada experimento, permitiu-se o tempo necessário para o relaxamento do músculo em solução de Ringer. Após o relaxamento, o músculo foi exposto à solução despolarizante contendo 100 mM de  $K^+$  para avaliar sua resposta e, após um período de 15 minutos em solução de Ringer, outra contratatura foi induzida por 30 mM de cafeína, finalizando assim o protocolo. Esta avaliação foi realizada em dois músculos. Para que o completo relaxamento do músculo fosse observado, foi necessário a manutenção do músculo em solução de Ringer por várias horas. Para os dois músculos, a resposta ao potássio não foi observada, sendo que observou-se resposta à cafeína (30 mM).

#### 2.2.4. Experimentos realizados com procaína em músculo sartório intacto de anfíbio

Na preparação de músculo intacto foi testado também o efeito da procaína sobre a contratatura induzida pelo perclorato, na qual procedeu-se fazendo primeiramente uma contratatura potássica (100 mM), em seguida o músculo foi exposto a uma solução contendo perclorato (50 mM). Após

o aparecimento da contratura, esperou-se que esta atingisse o seu platô e para obter-se o relaxamento, o músculo foi colocado em solução de Ringer Normal. Após o músculo ter relaxado, este foi induzido novamente a uma contratura potássica (100 mM) e incubado com procaína (10 mM) por 60 minutos. Decorrido os 60 minutos de exposição à procaína, foi realizada novamente a exposição do músculo a solução contendo perclorato (50 mM).

### 2.3. Preparação da fibra muscular desmembranada com uso de saponina

Após o acesso ao músculo sartório, dissecou-se um pequeno feixe do mesmo em Sol R (solução de relaxamento, vide tabela 2), à temperatura de 22°C, utilizando-se um microscópio estéreo binocular. Após a dissecação os feixes de fibras musculares foram transferidos e mantidos por 30 minutos numa câmara contendo Sol R, na qual adicionou-se 30µg/ml de saponina. Este glicosídeo interage com as moléculas de colesterol presentes no sarcolema e no sistema tubular transverso de fibras musculares, solubilizando-as e assim causando perfurações na membrana (LAUNIKOS & STEPHENSON, 1997). Estas estruturas são seletivamente permeabilizadas porque outros sistemas de membranas são destituídos de colesterol (MEISSNER & FLEISHER, 1971). Com a utilização desta técnica o RS bem como o sistema contrátil se mantém íntegros e funcionais. Com este procedimento permite o acesso dos constituintes das soluções ao RS e sistema contrátil possibilitando assim estudar os mecanismos de liberação e captação de íons cálcio do RS de músculo esquelético, cardíaco e liso. Com a utilização desta preparação, a contração da fibra muscular nos forneceu dados da quantidade de cálcio liberada pelo RS (GODT, *et al.*, 1993a e b; GODT, *et al.*, 1994).

Após o tratamento do feixe de fibras com saponina, o mesmo foi transferido para uma solução de idêntica composição porém na ausência deste glicosídeo. Deste feixe foi removido uma única fibra muscular. À seguir esta fibra teve uma de suas extremidades fixadas a um transdutor de força (Scientific Instruments G.M.B.H., Heidelberg, República Federal da Alemanha) mantido em posição estacionária e a outra a um braço móvel., mediante pinças de aço inoxidável. O registro da força de contração foi realizado num polígrafo (Gold Corporation, Cleveland, modelo 2108 XX). Um conjunto de câmaras, com capacidade para 2.5ml (cada câmara), construídas num bloco de acrílico móvel permitiu que a fibra fosse submetida a diferentes protocolos experimentais (NOSEK *et al.*, 1990; ZHU, & NOSEK, 1992; GODT *et al.*, 1993a). As soluções foram constantemente agitadas mediante barras metálicas magnetizadas por um agitador.

As células musculares desmembranadas (ou o feixe de miofibrilas) foram submetidas a diferentes soluções experimentais de acordo com o protocolo desejado. Os experimentos de medida de força de contração isométrica, foram realizados transferindo-se as fibras entre as diferentes soluções, contidas em pequenas câmaras com capacidade para 2.5ml construídas em uma placa de acrílico. Com este procedimento uma mesma fibra foi submetida à diferentes protocolos experimentais e dessa forma foi possível se utilizar as mesmas soluções para diferentes fibras. Assim, cada fibra muscular pode ser empregada como seu próprio controle.

### 2.3.1. Protocolo Experimental

Com o objetivo de se avaliar a capacidade do RS em captar, armazenar e liberar íons cálcio, e o papel do eugenol e do perclorato neste mecanismo foi desenvolvido um protocolo controle. Este protocolo consistiu primeiramente na passagem da célula pela Sol R (vide tabela

2), a qual permanecia 30 segundos, permitindo que a fibra permanecesse em repouso. Num segundo momento a fibra foi transferida para a Sol C (solução de carregamento), com a finalidade de se carregar o RS com íons cálcio, mantendo-se a fibra nesta solução por 2 minutos, tempo suficiente para se carregar o RS com cálcio (NOSEK *et al.*, 1997). Na sequência a fibra muscular foi transferida para a Sol L (vide tabela 2) a qual apresenta baixa concentração de EGTA (0.5 mM). A imersão da fibra nesta solução, teve como finalidade reduzir a capacidade de tamponamento de íons cálcio no interior das miofibrilas, o qual foi posteriormente liberado do retículo sarcoplasmático. Para tal, a preparação foi transferida para a Sol L na qual adicionou-se 30 mM de cafeína (KLEIN *et al.*, 1992). Como nesta solução a capacidade de tamponamento dos íons cálcio foi reduzida, isto permitiu que todo cálcio liberado do retículo sarcoplasmático ativasse o sistema contrátil. A contração muscular assim obtida forneceu um índice apropriado da quantidade de cálcio liberada do retículo sarcoplasmático (GODT *et al.*, 1993b; GODT *et al.*, 1994).

A ativação máxima do sistema contrátil foi obtida transferindo-se a fibra muscular da Sol R para a Sol FM (solução que induz a força máxima, vide tabela 2). Após obter-se o platô da força, o relaxamento da fibra foi obtido quando de sua transferência para a Sol R. Esse protocolo controle foi realizado no início e no final de cada experimento.

A avaliação do efeito do eugenol nos mecanismos de liberação de íons cálcio do RS foi realizado inicialmente através da passagem da fibra muscular pelas soluções do protocolo controle acima descrito. Após o protocolo controle, estando a fibra na Sol R, transferiu-se a mesma para a Sol C para que o RS fosse carregado novamente, permanecendo nesta por dois minutos. Na sequência, a célula foi mergulhada na Sol L (com o mesmo objetivo descrito acima) e posteriormente transferida para a Sol L na presença de eugenol (1, 5 e 10 mM). Para cada concentração desejada esperou-se atingir o platô e em seguida obteve-se o relaxamento, quando

de sua transferência para a Sol R. O protocolo controle descrito acima foi realizado também ao final de cada experimento.

O efeito do perclorato (9 e 36 mM) no mecanismo de liberação de cálcio do RS foi avaliado de forma semelhante ao descrito para o eugenol, sendo substituído apenas o eugenol pelo perclorato na Sol L. Novamente esperou-se a fibra atingir o platô para cada concentração desejada e o protocolo controle foi repetido no final de cada experimento, sempre que a fibra respondia.

Após se ter testado o efeito do eugenol (1 mM) e do perclorato (9 mM) separadamente, estudamos os efeitos da interação dos dois compostos no mecanismo de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Após se ter estabelecido as condições controle (carregamento e liberação de cálcio), procedeu-se novamente o carregamento do RS, e à seguir a fibra foi transferida para a Sol L (em ambas as condições na ausência de drogas) para em seguida ser transferida para uma câmara contendo a Sol L, na qual se adicionou o eugenol (1 mM). Manteve-se a preparação nesta solução por um período de tempo suficiente para que o efeito mecânico alcançasse o estado estacionário. Após este passo experimental a preparação foi transferida para a Sol R. Em uma série de experimentos, e sem ter sido feito o carregamento do RS, induziu-se a liberação de cálcio mediante a passagem da fibra pela Sol L contendo cafeína (30 mM). Em outra série de experimentos, após a condição controle, a fibra teve seu retículo novamente carregado com íons cálcio e em seguida realizou-se o controle posterior. Empregando-se as mesmas preparações realizou-se a avaliação do efeito do perclorato (9 mM), com protocolo idêntico ao descrito anteriormente para o eugenol. À seguir empregando-se as mesmas fibras e nas mesmas condições experimentais estudou-se os efeitos da interação do perclorato (9 mM) e do eugenol (1 mM), sendo realizado ao final de cada experimento o controle posterior.

Em outra série de experimentos empregou-se a procaína, um anestésico local, que atua bloqueando o canal de cálcio (RYR) da membrana do RS impedindo a liberação de cálcio através desse canal (SHOSHAN-BARMATZ & ASHLEY, 1998). A utilização desse composto teve como objetivo verificar se a contração induzida pelo eugenol ou pelo perclorato era decorrente da liberação de cálcio do RS. Para tal após o carregamento do RS e liberação de cálcio em condições controle e na presença de eugenol as fibras foram previamente incubadas com procaína, por um tempo suficiente para impedir a liberação de cálcio do RS (conforme testado com cafeína). Após a incubação com procaína testou-se na presença de eugenol (5 e 10 mM) ou cafeína (30 mM) o efeito desta droga. Para a avaliação do tempo necessário para obtenção do bloqueio da liberação de cálcio induzida por este composto, contraturas cafeínicas foram realizadas em tempo variável de incubação. Verificou-se que um período de incubação de 5 minutos, foi suficiente para abolir a capacidade de liberação de cálcio induzida por 30 mM de cafeína.

Foi testado de forma semelhante o efeito da procaína na contratura induzida pelo perclorato (36 mM). Seguindo-se o mesmo protocolo descrito acima, passando-se primeiramente a fibra pela série de soluções do protocolo controle, o retículo foi carregado novamente (como descrito acima), na seqüência passou-se a preparação pela Sol L e em uma outra câmara incubou-se a célula com procaína (10 mM) por 5 minutos. Após se ter verificado o efeito da procaína sobre a liberação de cálcio induzida pelo perclorato, também se verificou o efeito da procaína na liberação de cálcio do RS induzida pela cafeína (KLEIN *et al.*, 1992).

#### 2.4. Preparação de fibra desmembranada com o uso de Triton X-100

As células musculares provenientes de músculo sartório de rã foram obtidas de forma semelhante ao descrito no item 2.3. Com a finalidade de se avaliar a sensibilidade do sistema

contrátil ao íon cálcio, as fibras foram permeabilizadas com o emprego de Triton X-100. Para tal, adicionou-se à Sol R ( vide tabela 2) uma concentração final de 0.5% v/v deste detergente não iônico, permanecendo as fibras nesta solução por um período de 30 minutos. Ainda nesta mesma solução foram adicionados 0.1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 1 mM de benzamidina, que são bloqueadores enzimáticos, cuja finalidade é evitar a proteólise do sistema contrátil. As fibras assim obtidas tiveram suas membranas e todas as organelas subcelulares solubilizadas (GODT *et al.*, 1991). A montagem da preparação bem como a obtenção dos registros de força foram semelhante ao descrito no item 2.3. Todos os dados de força de contração isométricas foram normalizados para aqueles obtidos durante a ativação máxima da preparação, obtida quando mergulhou-se a fibra na solução com pCa 4.0 (Sol FM). A avaliação da sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio foi determinada na presença e ausência de eugenol (9 mM) ou perclorato (10 mM), mediante a ativação da preparação com concentrações crescentes deste íon até que a força máxima fosse obtida (GODT *et al.*, 1991).

Após a realização da curva força/concentração de cálcio controle (na ausência de droga), foi adicionado eugenol (5 mM) a seqüência crescente de íons cálcio, o mesmo foi realizado adicionando-se perclorato (9 mM). No final de cada experimento a curva controle foi repetida. Estes experimentos visaram verificar se drogas como o eugenol e o perclorato provocam um incremento na sensibilidade do sistema contrátil aos íons cálcio.

Os níveis de tensão máxima foram obtidos normalmente entre pCa 5.0 e pCa 4.0. Os níveis de força obtidos com as concentrações de íons cálcio insuficientes para se fazer a ativação máxima da preparação, foram normalizados para aqueles obtidos durante a ativação máxima. Os resultados de força versus concentração de íons cálcio foram ajustados na equação de Hill, através da técnica não linear dos mínimos quadrados:

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

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

## 2.5. Soluções

As soluções que foram empregadas para realização dos experimentos com músculo intacto estão descritas na tabela 1, sendo que as soluções com altas concentrações de KCL foram obtidas por modificações da solução de Ringer através da substituição isotônica de NaCl por KCL. As soluções contendo 40, 80 e 100 mM de  $\text{K}^+$  foram utilizadas para realizar-se a despolarização do sarcolema e induzir a contração. Estas soluções são denominadas na tabela 1 como Ringer 40, 80 e 100, respectivamente. As soluções contendo  $\text{ClO}_4^-$  foram preparadas através da substituição isotônica do NaCl por  $\text{NaClO}_4^-$ . Soluções contendo eugenol e cafeína foram preparadas pela adição da substância pura diretamente à solução.

Tabela 1: Composição das soluções utilizadas em preparações com músculo sartório intacto (em mM)

Componentes	Ringer Normal	Ringer 40	Ringer 80	Ringer 100	Ringer 0 Ca <sup>+2</sup>
Na <sup>+</sup>	110	74	34	14	110
K <sup>+</sup>	4	40	80	100	4
Mg <sup>+2</sup>	2	2	2	2	2
Ca <sup>+2</sup>	2	2	2	2	-
Cl <sup>-</sup>	122	122	122	122	122
TRIS	10	10	10	10	10
EGTA	-	-	-	-	1
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> *	0 a 150	0 a 2	0 a 2	0 a 150	0 a 150

Temperatura: 22°C pH: 7.4

\* Nas soluções onde adicionou-se esse ânion, reduziu-se a concentração de NaCl.

A composição das soluções usadas nos experimentos realizados com fibra isolada foram calculadas utilizando-se um programa de computador escrito em linguagem Turbo Pascal, empregando-se as constantes de equilíbrio descritas por Godt & Lindley. (GODT & LINDLEY, 1982). As tabelas 2 e 3 demonstram a composição das soluções empregadas nos protocolos experimentais realizado com fibra isolada permeabilizada com saponina e com Triton X-100.

Tabela 2: Composição das soluções (em mM), calculadas através do programa MS and BES (turbo-87 versão 3.0), utilizadas para os protocolos experimentais realizados com fibra permeabilizada com saponina ou Triton X-100 :

<b>Componentes</b>	<b>Sol R</b>	<b>Sol C</b>	<b>Sol L</b>	<b>Sol FM</b>
<b>EGTA</b>	5.0	5.0	0.5	5.0
<b>MgATP</b>	1.0	1.0	1.0	1.0
<b>CP</b>	15.0	15.0	15.0	15.0
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	1.0	1.0	1.0	1.0
<b>BES</b>	50.0	50.0	50.0	50.0
<b>pCa</b>	8.5	6.4	8.5	4.0
<b>Força iônica</b>	200	200	200	200

Temperatura: 22°C pH: 7.0

Tabela 3: Representa o volume das soluções com pCa 7.0 e com pCa 5.0 (em ml), calculadas através do programa GW-BASIC versão 3.2 empregadas para o preparo das soluções de pCa intermediários necessárias para a realização dos protocolos utilizados quando as fibras foram permeabilizadas com Triton X-100:

pCa	pCa 5.0 (ml)	pCa 7.0 (ml)
6.6	5.95452	19.04548
6.4	9.618036	15.38197
6.2	13.31538	11.68462
6.0	16.68228	8.317721
5.8	19.47415	5.525851
5.6	21.61814	3.381858
5.4	23.17084	1.829157
5.2	24.25455	0.745454

## 2.6. Reagentes Químicos

Todos os sais e substâncias utilizadas neste trabalho, foram obtidos da Sigma Chemical Co. (EGTA, Fluoreto de fenilmetilsulfonil, benzamidina, fosfocreatina, saponina, ATP, glicerol, MgCl<sub>2</sub>, BES, CaCl<sub>2</sub>, eugenol, procaína, Triton X-100 e cafeína), Merck (ácido metanosulfônico) e Reagen (KOH, KCl, NaCl, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, NaOH, TRIS).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Avaliação dos efeitos do eugenol em contratura induzida por 100 mM de K<sup>+</sup> em músculo sartório isolado de rã

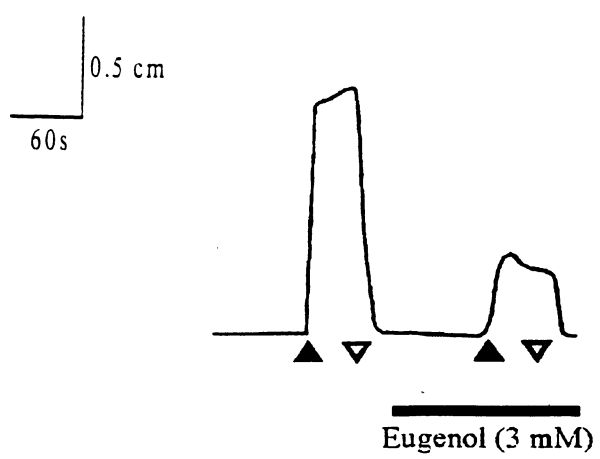
Os resultados da medida de força de contração realizados com músculo intacto em soluções contendo eugenol (0.1, 0.3, 1 e 3 mM), em contratura induzida por 100 mM de K<sup>+</sup> estão mostrados na figura 5. Nesta figura os níveis de força de contração estão normalizados para os valores obtidos em contratura potássica (100 mM). A força de contração em soluções contendo 0.1, 0.3, 1 e 3 mM de eugenol foram respectivamente de  $98,10 \pm 0,54$ ;  $46,37 \pm 14,61$ ;  $14,21 \pm 6,37$ ;  $10,14 \pm 10,14$  em relação ao controle. A concentração de eugenol suficiente para produzir 50% de inibição da contratura potássica foi de aproximadamente 0,3 mM.

#### 3.2. Efeito do eugenol (10 mM) em solução contendo 4 mM de K<sup>+</sup> ou 100 mM de K<sup>+</sup> em músculo sartório isolado de rã

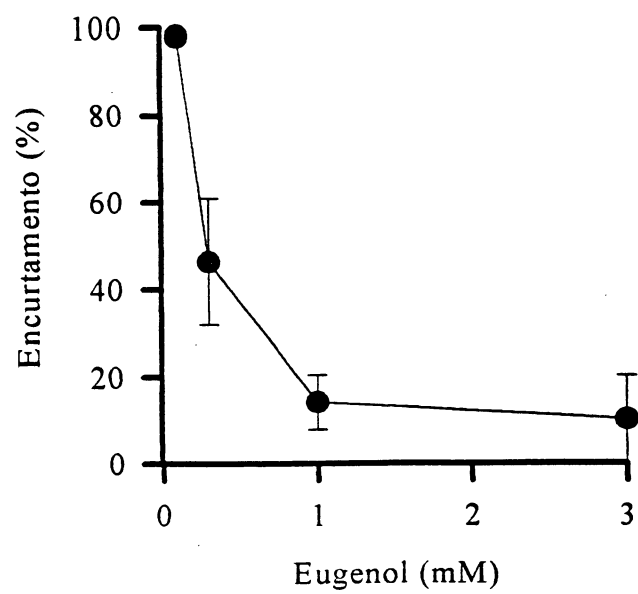
O efeito do eugenol (10 mM) na solução contendo 4 mM de K<sup>+</sup> está demonstrado na figura 6. Como pode ser verificado, o eugenol nesta concentração é capaz de induzir contratura por si só. O encurtamento produzido pelo eugenol em solução contendo 4 mM de K<sup>+</sup> foi de  $100,53 \pm 10,37$  e em solução contendo 100 mM de K<sup>+</sup> foi de  $148,42 \pm 18,0$  do obtido por contratura induzida por 100 mM de K<sup>+</sup>. Após a contratura ter alcançado o estado estacionário esta se manteve por mais de doze horas mesmo na ausência do eugenol.

**Figura 5-** Efeito do eugenol (0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mM) na contratura induzida por 100 mM de  $K^+$  em músculo sartório isolado de rã. Em a: Registro original de um experimento típico, mostrando a primeira contratura induzida por 100 mM de  $K^+$  e na seqüência o bloqueio da mesma, promovida por 3 mM de eugenol. A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta ao eugenol. Os símbolos fechado ( $\blacktriangle$ ) e aberto ( $\triangle$ ) indicam o momento em que a preparação foi exposta à solução contendo alta concentração de  $K^+$  (100 mM) e o momento em que a mesma foi exposta a solução de Ringer Normal (4 mM  $K^+$ ), respectivamente. Calibração: a barra vertical indica o encurtamento (em centímetros) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em b: O símbolo ( $\bullet$ ) representa os valores de encurtamento (em valores percentuais), obtidos na presença de eugenol, durante a exposição da preparação à uma solução contendo 100 mM de  $K^+$ . Os valores experimentais de encurtamento foram normalizados para os obtidos nas condições controle (contratura com 100mM de  $K^+$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão.

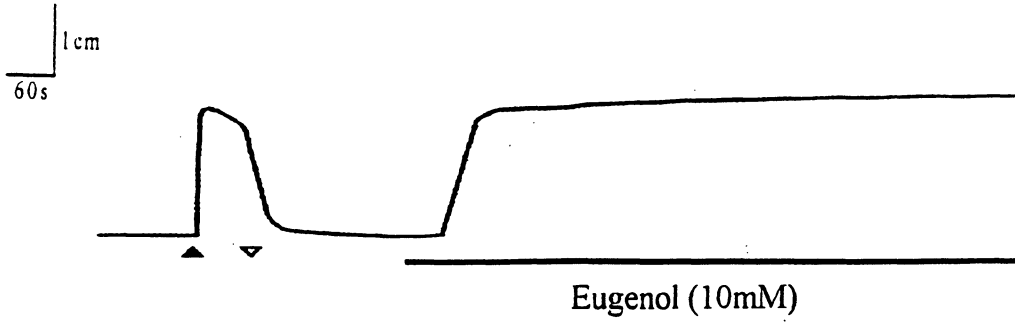
A



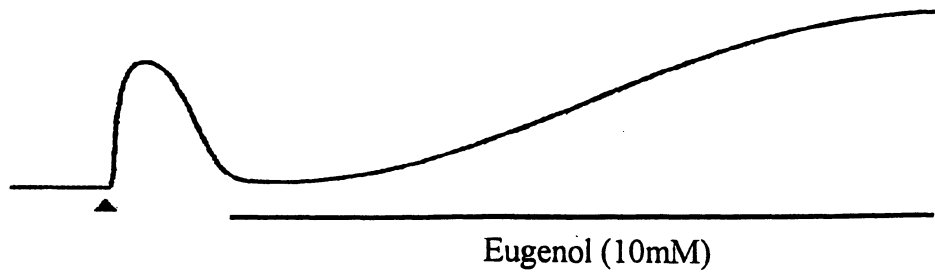
B



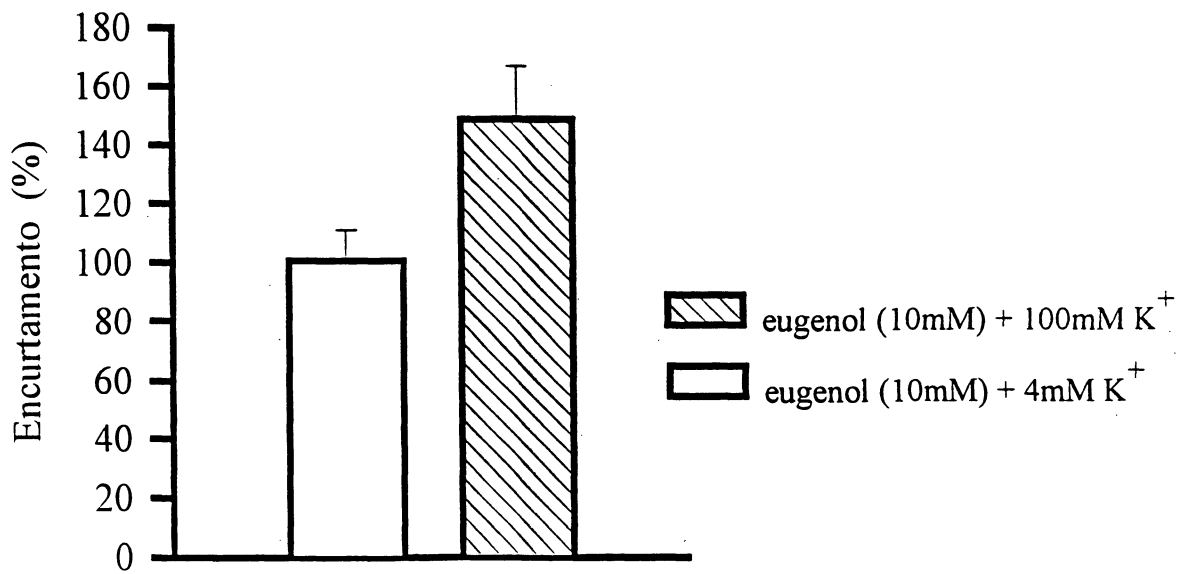
**Figura 6-** Efeito do eugenol (10 mM) em músculo sartório isolado de rã mantido em solução extracelular contendo 4 ou 100 mM de  $K^+$ . Em **a**: Registro original de um experimento típico, mostrando primeiramente a contratura induzida por 100 mM de  $K^+$  e posteriormente uma contratura sustentada, induzida por eugenol (10 mM) de uma preparação mantida em 4 mM de  $K^+$ . Em **b**: Após a contração muscular induzida por 100 mM de  $K^+$ , a preparação foi mantida nesta solução, na qual adicionou-se 10 mM de eugenol. A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta a 10 mM de eugenol. Os símbolos fechado ( $\blacktriangle$ ) e aberto ( $\triangle$ ) indicam o momento em que a preparação foi exposta à solução contendo alta concentração de  $K^+$  (100 mM) e o momento em que a mesma foi exposta a solução de Ringer Normal (4 mM de  $K^+$ ), respectivamente. Calibração: a barra vertical indica o encurtamento (em centímetros) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **c**: Representação gráfica do encurtamento muscular promovido pelo eugenol (10 mM) em preparações mantidas em 4 ou 100 mM de  $K^+$ , respectivamente. Os dados foram normalizados para aqueles valores de encurtamento obtidos em 100mM de  $K^+$ , e estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão.



B



C



### 3.3. Efeito do eugenol (3 mM) em contratura induzida por cafeína (2 mM) em músculo sartório isolado de rã

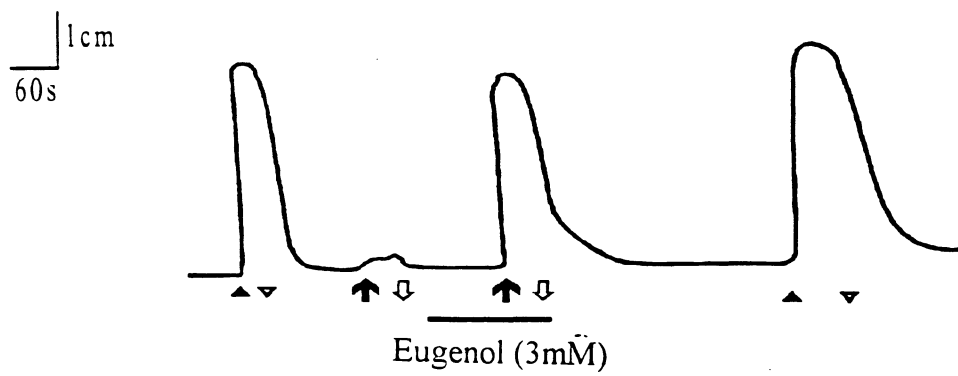
O efeito do eugenol (3 mM) na contratura induzida por cafeína (2 mM) está representado na figura 7. O valor médio de encurtamento muscular induzido pela cafeína foi de  $12,07 \pm 3,41$ . Na presença de 3 mM de eugenol o valor obtido foi de  $2,46 \pm 1,02$ . Contudo quando adicionou-se ambos compostos nas concentrações acima descritas o encurtamento foi de  $136,58 \pm 24,92$  como percentagem dos valores obtidos inicialmente em contratura induzida por 100 mM de  $K^+$ . Como pode ser verificado, o eugenol induziu um efeito potencializador na contratura cafeínica. Contudo, como pode ser verificado na figura 5, o eugenol na concentração de 3 mM promove bloqueio da contratura induzida por 100 mM de  $K^+$ .

### 3.4. Efeito do perclorato (2 mM) nas contraturas induzida por $K^+$ (40, 80 e 100 mM) em músculo sartório isolado de rã

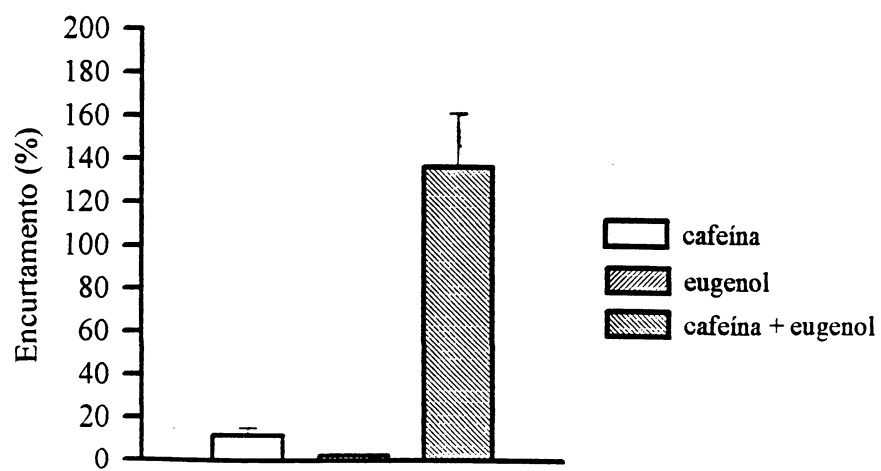
Os efeitos de 2 mM de perclorato nas contraturas induzidas por 40, 80 e 100 mM de  $K^+$  estão demonstrados na figura 8. No painel a, como pode ser verificado, a adição de 2 mM de perclorato nas contraturas induzidas por 40, 80 e 100 mM de  $K^+$ , produziu um efeito potencializante sobre estas contraturas. Os dados obtidos em contraturas induzidas por 40, 80 e 100 mM de  $K^+$  na ausência de perclorato foram de  $0 \pm 0$ ,  $0,1 \pm 0,05$ ;  $1,5 \pm 0,67$ ;  $1,4 \pm 0,65$ ;  $2,1 \pm 0,95$ , respectivamente. Na presença deste íon e nas concentrações de  $K^+$  acima descritas os valores obtidos foram de  $0 \pm 0$ ;  $0 \pm 0$ ;  $7,2 \pm 0,8$ ;  $11,68 \pm 1,12$ ;  $12,63 \pm 1,2$ . Esses dados estão representados graficamente no painel b da figura 8. Na ordenada estão os valores de encurtamento muscular (cm), e na abcissa, as concentrações de  $K^+$  das soluções de Ringer empregadas. Como pode ser verificado a presença de 2 mM de perclorato deslocou a curva de encurtamento muscular para uma dada concentração extracelular de  $K^+$  para esquerda.

**Figura 7-** Efeito do eugenol (3 mM) na contratatura induzida por cafeína (2 mM) em músculo sartório isolado de rã. Em **a**: Registro original de um experimento típico, onde a primeira e a quarta contraturas foram obtidas com 100 mM de  $K^+$ . A segunda e a terceira contraturas foram induzidas pela cafeína (2 mM) na ausência e na presença de 3 mM de eugenol, respectivamente. Os símbolos ( $\uparrow$ ) e ( $\Downarrow$ ), representam, respectivamente, o momento em que adicionou-se e removeu-se a cafeína da câmara. A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta a 3 mM de eugenol. Os símbolos fechado ( $\blacktriangle$ ) e aberto ( $\triangle$ ) indica o momento em que a preparação foi exposta à solução contendo alta concentração de  $K^+$  (100 mM) e o momento em que a mesma foi exposta a solução de Ringer Normal (4 mM  $K^+$ ), respectivamente. Calibração: a barra vertical indica o encurtamento (em centímetros) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **b**: Gráfico representando, na primeira, segunda e terceira colunas, os valores percentuais da contratatura induzida pela cafeína, eugenol e de ambos, respectivamente. Os dados de encurtamento, expressos na ordenada representam a média  $\pm$  o erro padrão e foram normalizados para os obtidos em 100 mM de  $K^+$ .

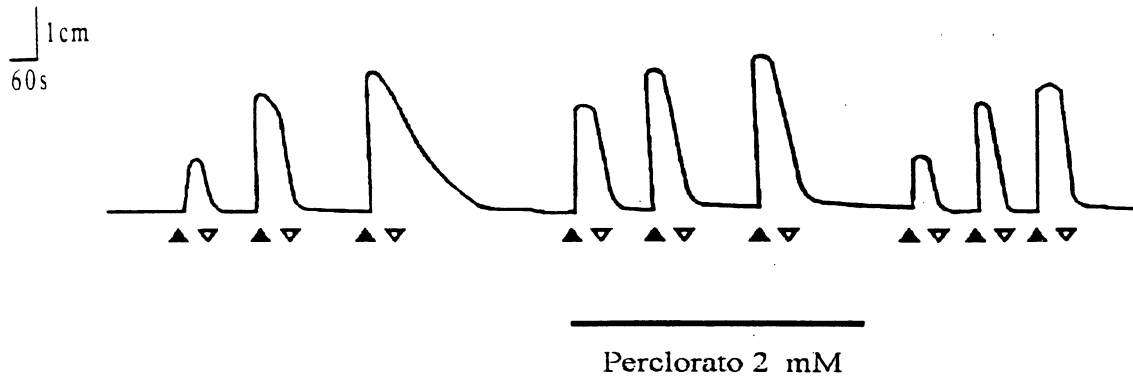
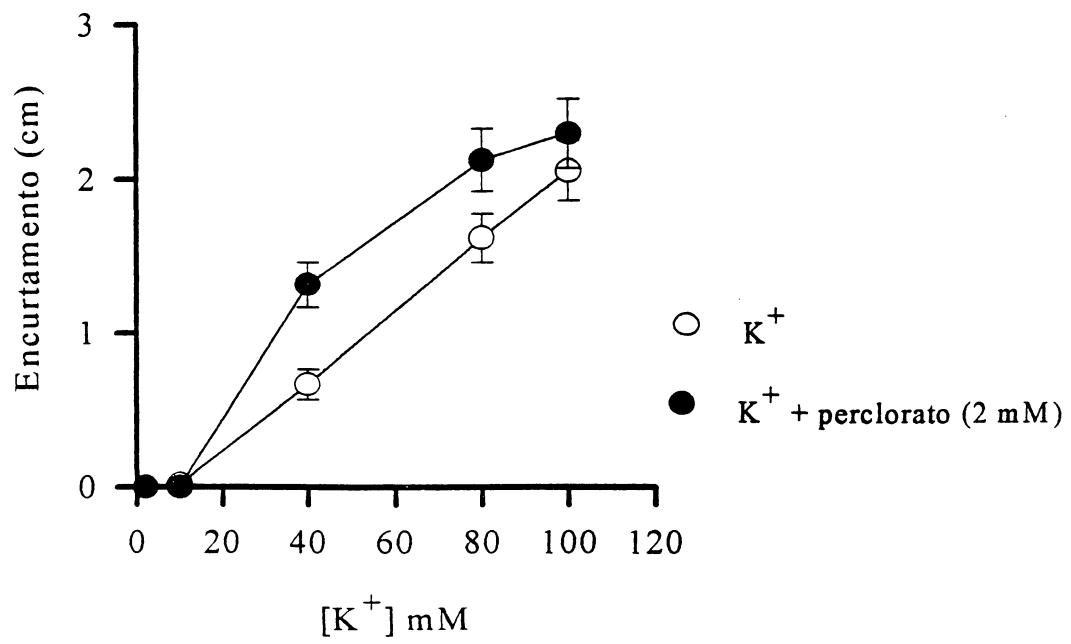
A



B



**Figura 8-** Efeito do perclorato (2 mM) na contratura induzida por 40, 80 ou 100 mM de  $K^+$  em músculo sartório isolado de rã. Em **a**: Registro original de um experimento típico, onde se verifica, na seqüência, as contraturas induzidas por 40, 80 e 100 mM de  $K^+$ . As três primeiras e as três últimas contraturas foram obtidas na ausência de perclorato e as três contraturas intermediárias na presença deste ânion. A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta ao perclorato. Os símbolos fechados ( $\blacktriangle$ ) indicam os momentos em que a preparação foi exposta respectivamente à solução contendo alta concentração de  $K^+$  (40, 80 ou 100 mM) e o símbolo aberto ( $\triangle$ ) o momento em que a mesma foi exposta a solução de Ringer Normal (4 mM  $K^+$ ). Calibração: A barra vertical indica encurtamento (em centímetros) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **b**: Representação gráfica dos valores de encurtamento muscular obtidos em soluções contendo 40, 80 e 100 mM de  $K^+$ . Os símbolos aberto e fechado representam os valores de encurtamento muscular obtidos na ausência e na presença de perclorato, respectivamente. Os valores de encurtamento muscular (em centímetros) estão representados na ordenada, e da concentração extracelular de  $K^+$  na abcissa. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  o erro padrão.

**A****B**

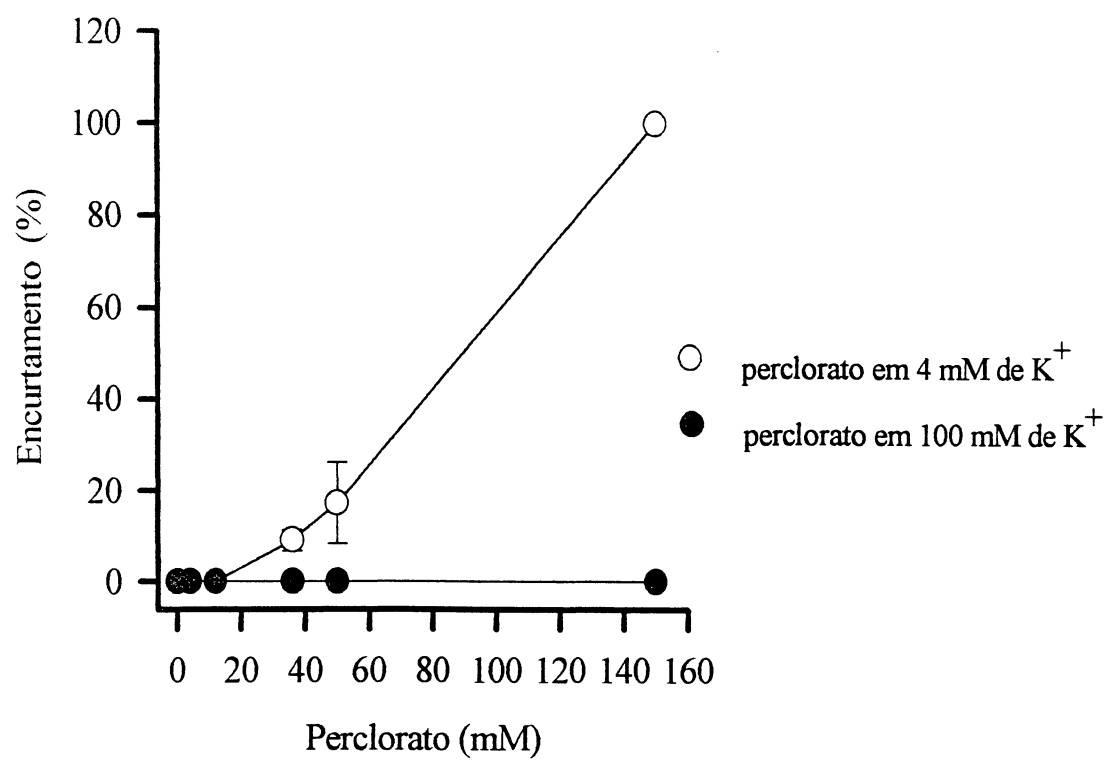
**Figura 9-** Efeito de concentrações crescentes de perclorato (0,1 à 150 mM) em músculo sartório isolado de rã mantidos em solução contendo 4 ou 100 mM de  $K^+$ . Representação gráfica dos valores de encurtamento desenvolvidos em preparações submetidas à soluções contendo concentrações crescentes de perclorato (0,1 à 150 mM) em 4 mM de  $K^+$  (símbolo aberto) e em 100 mM de  $K^+$  (símbolo fechado). A ordenada expressa os valores de encurtamento muscular (em percentuais) da contratura obtida em 100 mM de  $K^+$  e a abcissa a concentração extracelular de perclorato.

### 3.5. Curva dose/resposta ao perclorato (0.1 à 150 mM) em 4 mM de $K^+$ ou em 100 mM de $K^+$ em músculo sartório isolado de rã

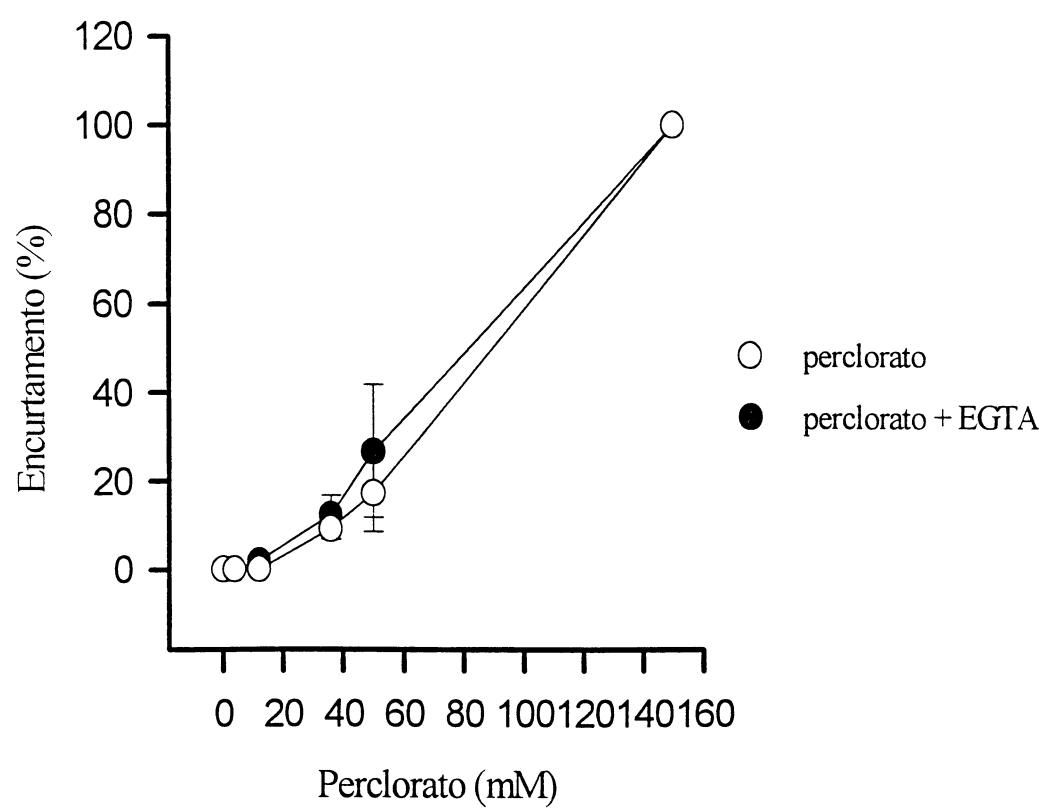
O efeito de concentrações crescentes (0,1 à 150 mM) de perclorato em solução contendo 4 mM ou 100 mM de  $K^+$  está representado na figura 9. O registro original de um experimento no qual a preparação esteve exposta à concentrações crescentes de perclorato na presença de 4 mM de  $K^+$  está representado na figura 12a. Como pode se verificar o efeito contraturante do perclorato só se manifesta quando a concentração externa de  $K^+$  é de 4 mM. A elevação da concentração extracelular de  $K^+$  para 100 mM fez com que ocorresse inibição dessa contratura. Conforme descrito em materiais e métodos, a adição de perclorato à solução, foi realizada nas preparações mantidas em 4 ou em 100 mM de  $K^+$ . Esses dados demonstram claramente que o efeito contraturante do perclorato só se manifesta quando o potencial de membrana das células musculares são mantidas num nível muito baixo (próximos ao potencial de repouso).

### 3.6. Efeito da remoção do cálcio externo na curva dose/resposta induzida pelo perclorato em 4 mM de $K^+$ em músculo sartório isolado de rã

Para se avaliar o efeito da remoção do cálcio externo na curva dose/resposta ao perclorato, foi utilizado 1 mM de EGTA. Os dados obtidos nestas condições experimentais está demonstrado na figura 10. A remoção do cálcio extracelular e a adição de EGTA que teve como objetivo reduzir a concentração de cálcio que poderia provir como contaminante não impediu que as preparações desenvolvessem encurtamento. Não houve diferença estatisticamente significativa, no grau de encurtamento induzido por concentrações crescentes de perclorato entre o grupo controle (solução contendo 2 mM de cálcio) e aquela onde o cálcio foi omitido a qual adicionou-se EGTA.



**Figura 10-** Efeito da remoção do íon cálcio externo na contratura induzida pelo perclorato (0,1 à 150 mM) em músculo sartório isolado de rã mantido em solução contendo 4 mM de  $K^+$ . O símbolo aberto (o) e fechado (●) representam os valores de encurtamento muscular obtidos com solução contendo concentrações crescentes de perclorato mantidas em solução de Ringer Normal ( $[Ca^{+2}=2\text{ mM}]_e$ ) ou em soluções de Ringer de cuja composição omitiu-se o cálcio e adicionou-se EGTA (1 mM), respectivamente. Os valores de encurtamento muscular foram normalizados para aqueles obtidos em contratura potássica ( $[K^+=100\text{mM}]_e$ ).



### 3.7. Efeito da procaína (10 mM) na contratura induzida pelo perclorato (50 mM) em músculo sartório isolado de rã

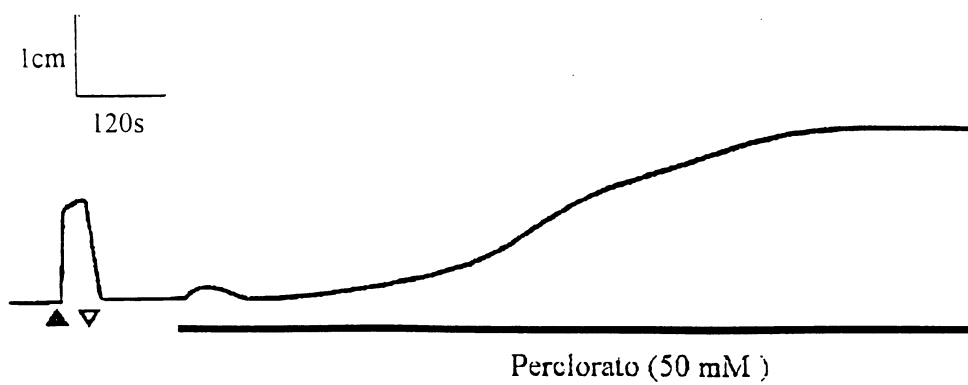
Na figura 11 está representado graficamente os dados de encurtamento muscular obtidos durante a exposição do músculo sartório isolado de rã à 100 mM de  $K^+$ , 50 mM de perclorato na presença e na ausência de procaína (10 mM). Os valores de encurtamento muscular médio (em cm) obtido em 100 mM de  $K^+$  foi de  $6,07 \pm 1,31$  e em 50 mM de perclorato na ausência e na presença de procaína, foram respectivamente de  $11,43 \pm 1,66$ ,  $0,20 \pm 0,0$ . Estes dados demonstram que a prévia incubação das preparações com procaína foi eficiente em bloquear o efeito contraturante do perclorato.

### 3.8. Efeito do eugenol (1 mM) na contratura induzida por concentrações crescentes de perclorato em preparações de músculo sartório isolado de rã mantidos em Ringer Normal

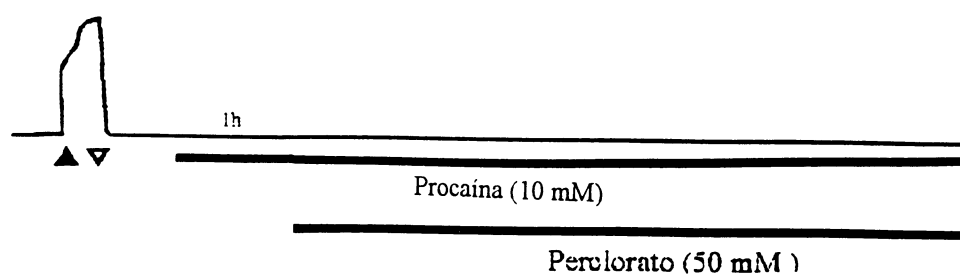
O efeito do eugenol na contratura induzida por perclorato foi avaliado em preparações mantidas em solução contendo 4 mM de  $K^+$ . Conforme demonstrado no painel a da figura 12, o perclorato induziu contração muscular em preparações mantidas em solução contendo 4 mM de  $K^+$ . Quando estas preparações foram incubadas com 1 mM de eugenol o efeito contraturante do perclorato foi potencializado, conforme demonstrado no painel b da figura 12. A concentração de perclorato necessária para produzir 50% da força máxima na ausência e na presença de eugenol foi de cerca 90 mM e 39 mM, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Tanto a contratura induzida por perclorato quanto aquela induzida por este ânion na presença de eugenol foram sustentadas.

**Figura 11-** Efeito da procaína (10 mM) na contratura induzida pelo perclorato (50 mM) em músculo sartório isolado de rã. Em **a**: Registro original de um experimento típico, demonstrando uma contratura induzida por 100 mM de  $K^+$ , e na seqüência, uma contratura induzida por 50 mM de perclorato. Em **b**: Após a contratura potássica, a preparação foi incubada com procaína (10 mM) por uma hora e à seguir adicionou-se o perclorato (50 mM), na presença deste anestésico. As barras horizontais representam os momentos em que a preparação foi submetida ao perclorato e à procaína, como indicado na figura. Os símbolos fechado ( $\blacktriangle$ ) e aberto ( $\triangle$ ) indicam o momento em que a preparação foi exposta à solução contendo 100 mM de  $K^+$  e o momento em que a mesma foi exposta a solução de Ringer Normal (4 mM  $K^+$ ), respectivamente. Calibração: A barra vertical indica o encurtamento muscular (em centímetros) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em **c**: Representação gráfica dos dados obtidos conforme protocolo demonstrado em **a** e **b**. A ordenada representa os valores de encurtamento (em centímetros) e a abcissa as condições experimentais a qual a preparação foi submetida à 100 mM de  $K^+$ , 50 mM de perclorato e 50 mM de perclorato e 10 mM de procaína. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  o erro padrão.

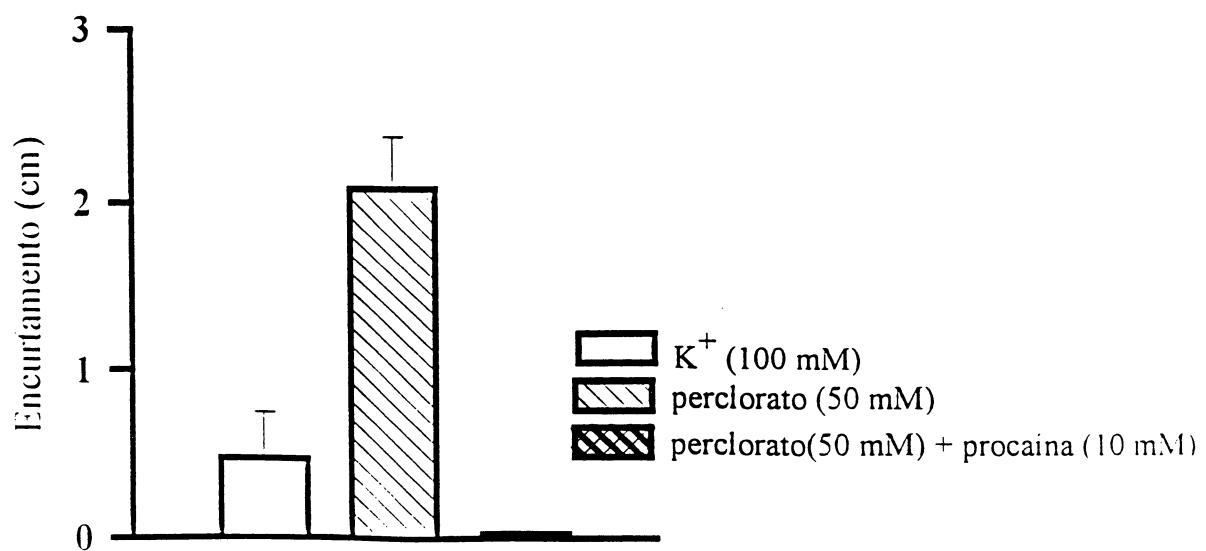
A



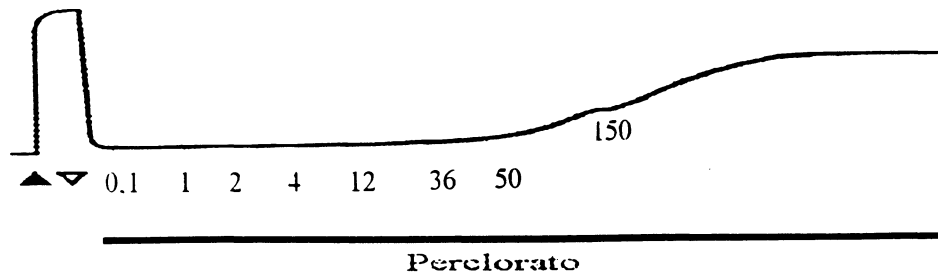
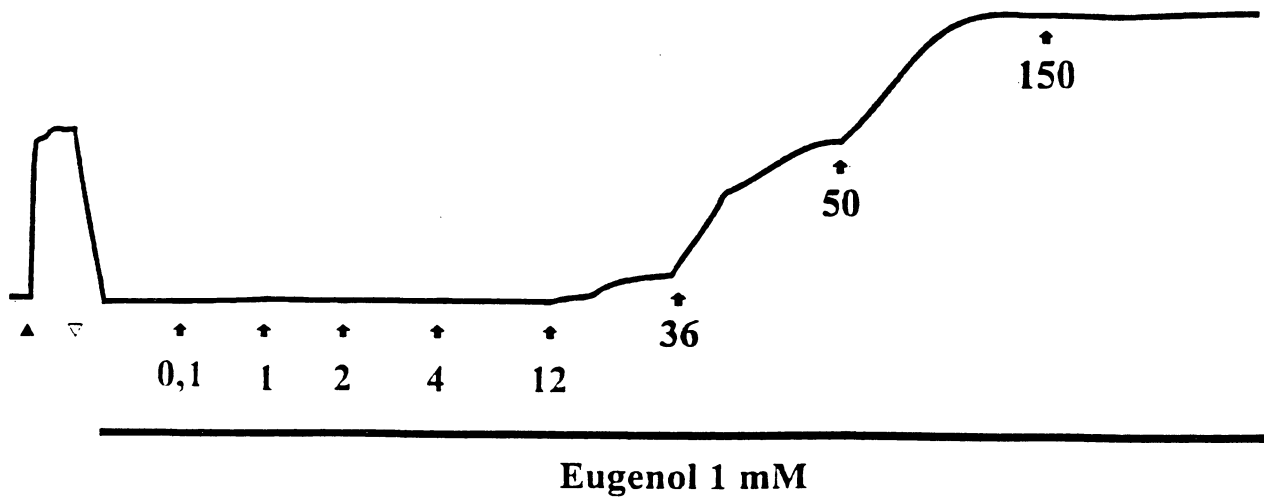
B



C

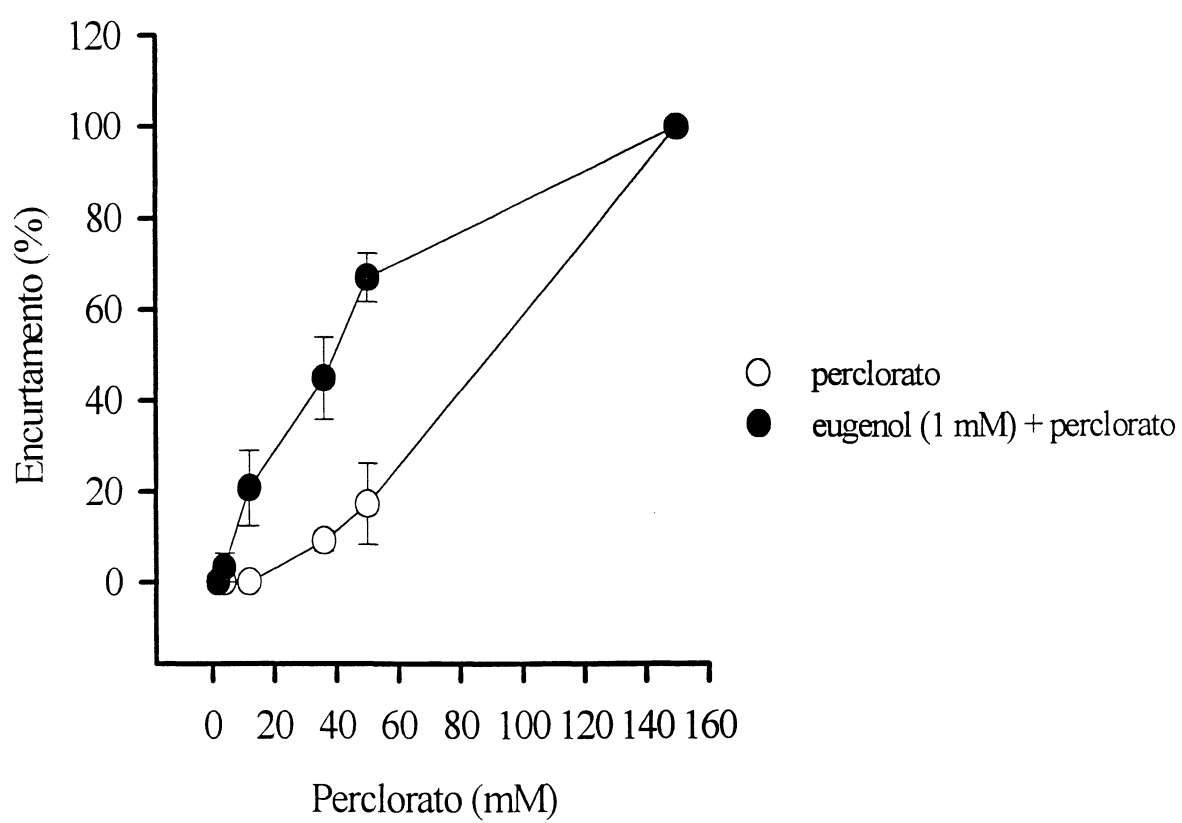


**Figura 12-** Efeito do eugenol (1 mM) na contratura induzida por concentrações crescentes de perclorato (0,1 à 150 mM) em músculo sartório isolado de rã mantidos em solução de Ringer Normal (4 mM  $K^+$ ). Em **a**: Após uma contratura induzida por 100 mM de  $K^+$ , adicionou-se à solução de Ringer Normal, o ânion perclorato até obter-se a concentração desejada (de 0,1 à 150 mM), na ausência de eugenol (em **a**) e na presença deste composto (em **b**). Os símbolos fechado ( $\blacktriangle$ ) e aberto ( $\triangle$ ) indicam os momentos em que a preparação foi exposta à solução contendo alta concentração de  $K^+$  e o momento em que a mesma foi exposta a solução de Ringer Normal (4 mM  $K^+$ ), respectivamente. As barras horizontais representam o tempo de exposição da preparação ao perclorato (em **a**) e a associação desse ao eugenol (em **b**). Calibração: A barra vertical indica o encurtamento (em centímetros) e a horizontal, o tempo (em minutos).

**A**0.5 cm  
15 mm**B**

Em c: Representação gráfica do efeito da interação do íon perclorato (0,1 à 150 mM) e eugenol (1 mM) em preparações mantidas em solução contendo 4 mM de  $K^+$ . Nesta figura o símbolo (o) representa os valores de encurtamento obtidos em preparações submetidas às soluções contendo concentrações crescentes de perclorato e o símbolo (●) essas mesmas preparações na presença de perclorato (0,1 à 150mM) e eugenol (1 mM). Na ordenada estão representados os valores de encurtamento (em percentagem) daqueles obtidos em 100mM de  $K^+$  e na abcissa os valores crescentes (0,1 à 150mM) da concentração extracelular de perclorato.

C



3.9. Efeito da interação do íon perclorato (2 mM) e eugenol (0.1, 0.3, 1 e 3 mM) na contratatura induzida por 40 mM de  $K^+$  em músculo sartório isolado de rã

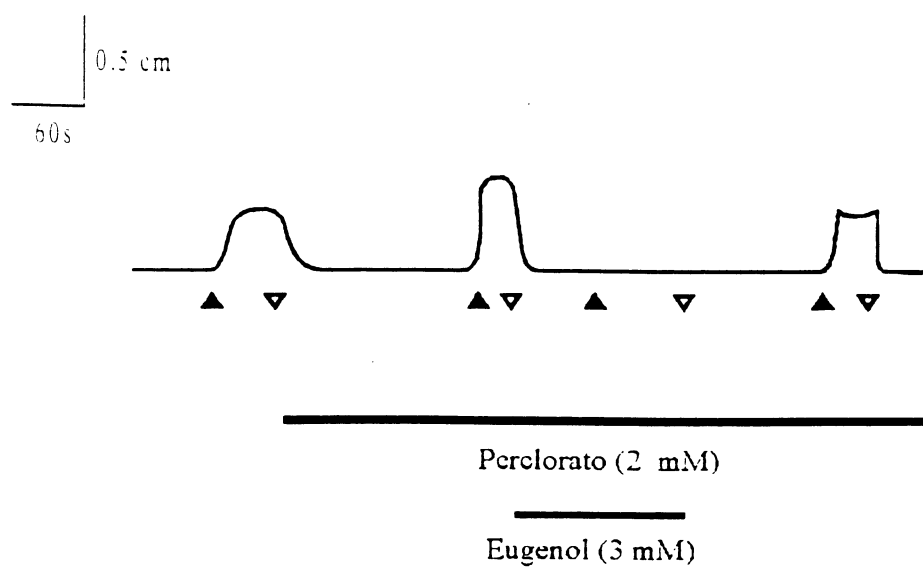
De acordo com o painel a da figura 8, verifica-se que 2 mM de perclorato na presença de 40 mM de  $K^+$  foi capaz de induzir a um aumento de cerca de duas vezes àquele obtido na ausência deste ânion. Diante deste dado, tentou-se verificar o efeito da interação do perclorato com o eugenol (0.1, 0.3, 1 e 3 mM) na presença de 40 mM de  $K^+$ , como está representado na figura 12. Os valores de encurtamento muscular médio obtidos na presença de perclorato em relação à 40 mM de  $K^+$  foram de  $140,19 \pm 8,19$ ;  $143,61 \pm 9,61$ ;  $135,93 \pm 62,69$ ;  $136,68 \pm 79,41$ . Quando da associação deste ânion com o eugenol (0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mM, respectivamente os valores de encurtamento muscular foram de  $137,58 \pm 7,58$ ;  $87,90 \pm 12,10$ ;  $9,26 \pm 9,26$ ;  $1,00 \pm 1,0$ .

3.10. Efeito do eugenol (1, 5 e 10 mM) ou cafeína (30 mM) na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina

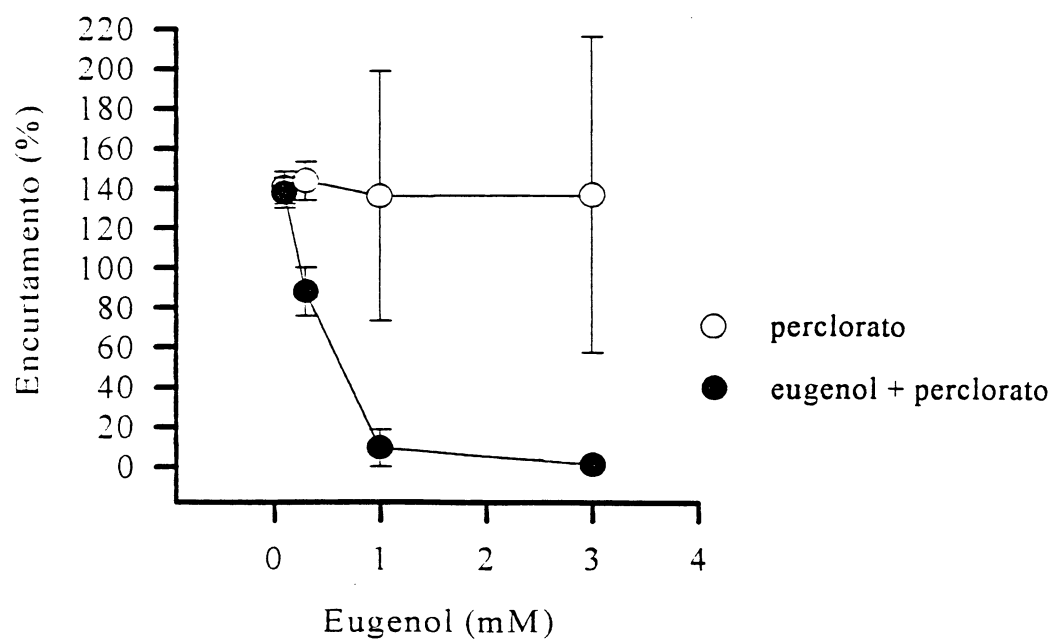
Os dados obtidos em músculo intacto demonstraram que o eugenol foi capaz de induzir a contração muscular quando empregado as concentrações deste composto acima de 3 mM. Em fibras permeabilizadas com saponina, nas quais são preservadas as funções do retículo sarcoplasmático e do sistema contrátil, é possível testar a possibilidade de que uma substância possa induzir a contração muscular por liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Utilizando-se desta preparação testamos tal hipótese. Para tal, após o retículo sarcoplasmático ter sido carregado com íons cálcio, expusemos as preparações à concentrações crescentes de 1, 5 e 10 mM de eugenol.

**Figura 13-** Efeito da interação do íon perclorato (2 mM) e eugenol (0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mM) na contratatura induzida por 40 mM de  $K^+$  em músculo sartório isolado de rã. Em a: Registro original de um experimento típico, mostrando uma contratatura induzida por 40 mM de  $K^+$  (controle), na ausência de perclorato. À seguir a preparação foi submetida à soluções contendo 2 mM de perclorato na ausência e na presença de eugenol (3 mM). Entre a segunda e a terceira contratatura induzida por 40 mM de  $K^+$ , a preparação foi previamente incubada com eugenol (3 mM), o qual bloqueou a resposta contrátil induzida por 40 mM de  $K^+$ . O símbolo fechado ( $\blacktriangle$ ) indica o momento em que a preparação foi exposta à solução contendo alta concentração de  $K^+$  (40 mM) e o aberto ( $\triangle$ ) o momento em que a mesma foi exposta a solução de Ringer Normal (4 mM  $K^+$ ), ambas contendo ou não as substâncias testadas. A barra horizontal representa o tempo de exposição da preparação ao perclorato e ao eugenol. Calibração: A barra vertical indica o encurtamento (em centímetros) e a horizontal, o tempo (em segundos). Em b: O símbolo aberto (o) expressa os valores de encurtamento muscular induzido por 40 mM de  $K^+$  (em porcentagem), obtido na presença de 2 mM de perclorato e o símbolo fechado ( $\bullet$ ) àqueles obtidos na presença de perclorato e eugenol (0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mM). A ordenada representa os valores de encurtamento (em cm) normalizados para aqueles obtidos em 40 mM de  $K^+$  e a abcissa representa as concentrações de eugenol utilizadas.

A



B

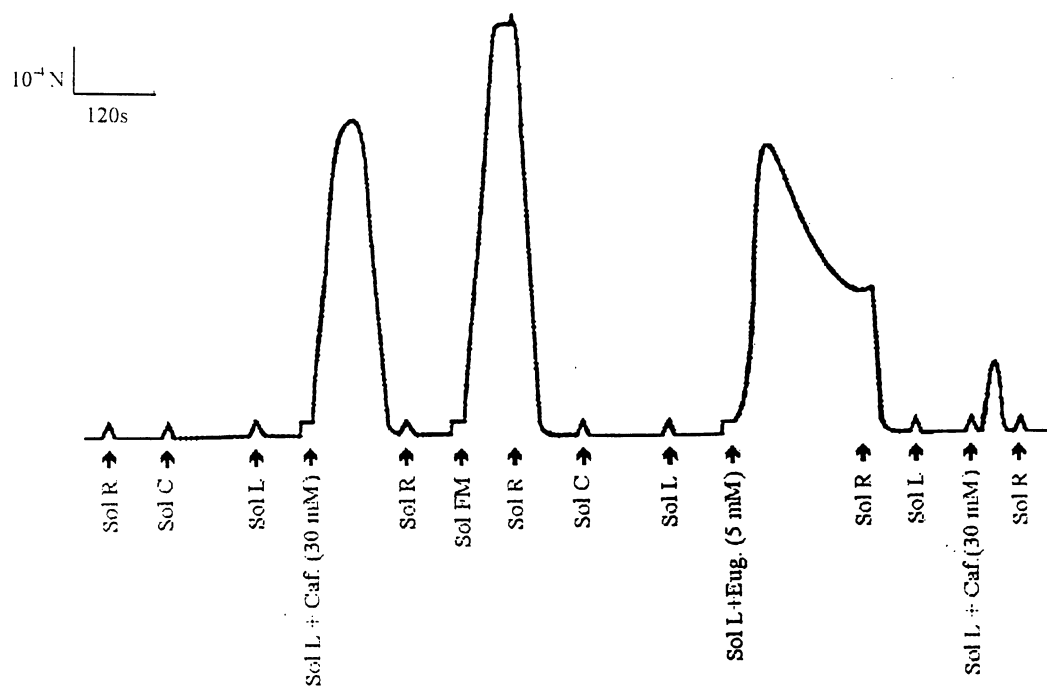
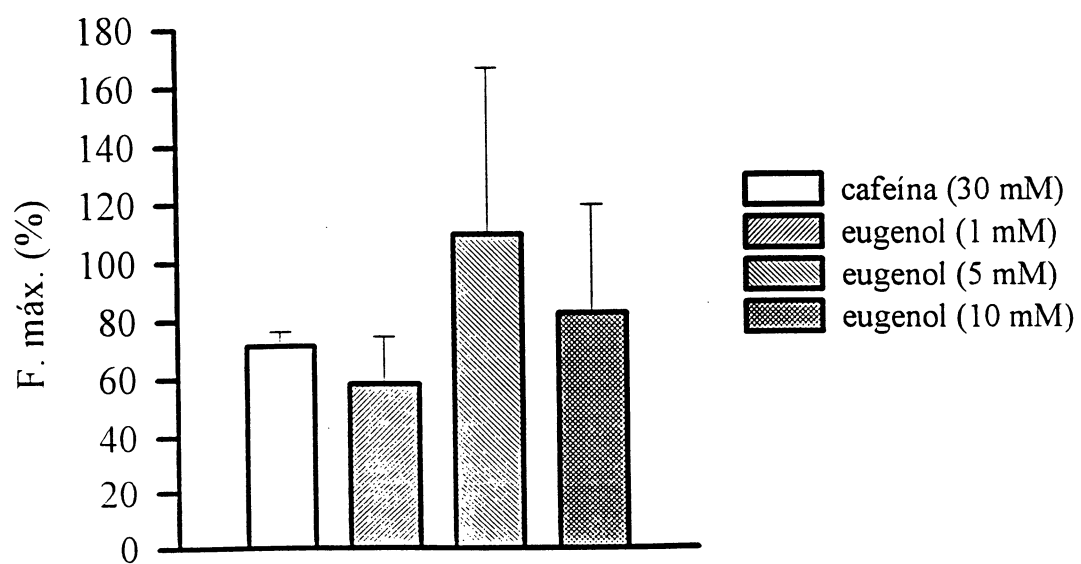


Verificamos que o eugenol induziu contração muscular em todas as concentrações utilizadas. Os valores de força muscular obtidos na presença de eugenol 1, 5 e 10 mM foram respectivamente de  $58,23 \pm 16,08$ ,  $109,62 \pm 56,93$  e  $82,39 \pm 37,19$ , daquela produzida pela ativação máxima do sistema contrátil (induzida com pCa 4.0). Nestes experimentos utilizamos também de cafeína, por ser uma substância capaz de induzir a liberação de cálcio através dos canais de cálcio (RYR) presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (DUKE & STEELE, 1998). Com o emprego de 30 mM de cafeína a força desenvolvida pelas fibras musculares atingiram  $71,20 \pm 4,9$  da força máxima.

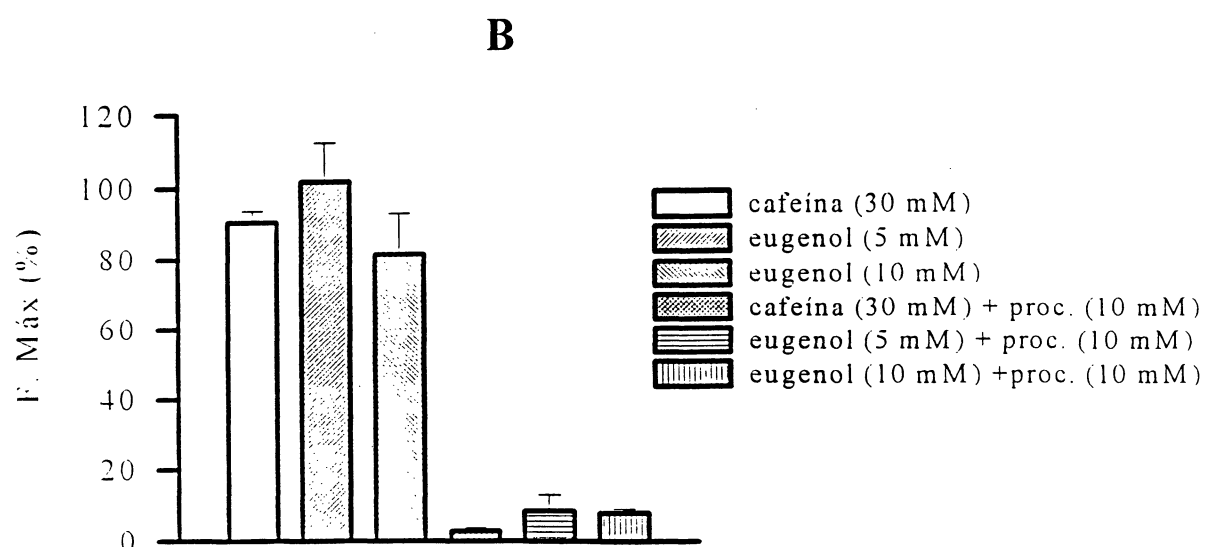
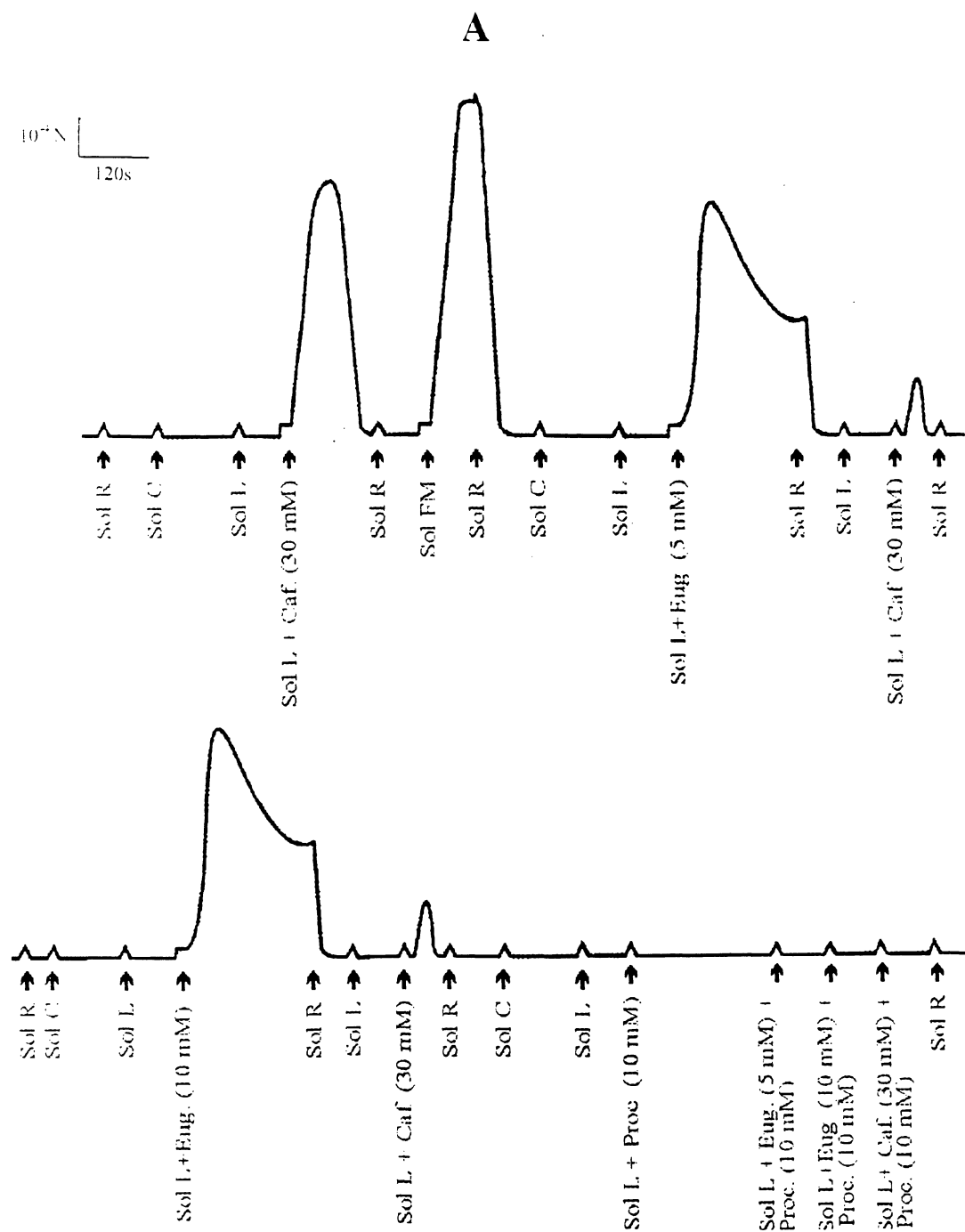
### 3.11. Efeito da procaína (10 mM) sobre as contraturas induzidas pelo eugenol (5 ou 10 mM) ou cafeína (30 mM) em fibra permeabilizada com saponina

Sabe-se que a procaína é um potente bloqueador de canais de cálcio do retículo sarcoplasmático (RYR) (MARTIN *et al.*, 1993; SHOSHAN-BARMATZ & ZCHUT, 1993; XU *et al.*, 1993). Com isso, utilizou-se deste composto, para verificar se o efeito contraturante do eugenol (descrito no item anterior) seria decorrente da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Para tal, após o retículo sarcoplasmático ter sido carregado com cálcio, a preparação foi exposta, durante cinco minutos, à Sol L, na qual adicionou-se procaína (10 mM). Passado o tempo de incubação com procaína, a fibra foi transferida para a Sol L na presença de eugenol (5 ou 10 mM) e procaína. Idêntico protocolo foi realizado com a cafeína (30 mM). Os dados obtidos demonstram que a procaína bloqueia a contração induzida pela cafeína ou pelo eugenol. Os valores de força muscular (em percentual da força máxima) obtidos previamente à incubação das preparações com a procaína, foram de  $101,79 \pm 10,61$  e  $81,80 \pm 11,16$  para 5 e 10 mM de eugenol, respectivamente. A prévia incubação das preparações com procaína reduziu

**Figura 14-** Efeito do eugenol (1, 5 ou 10 mM) ou cafeína (30 mM) na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina. Em **a**: Registro original de um experimento típico, demonstrando a ativação do sistema contrátil induzida pela liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático quando da utilização da cafeína, de eugenol (5 mM), ou pela exposição da fibra à Sol FM (pCa 4,0). Após a fibra ter sido mantida na Sol C (pCa 6,4) por dois minutos com a finalidade de promover o carregamento do retículo sarcoplasmático com cálcio, esta foi transferida para a Sol L (pCa 8,5, 0,5 mM de EGTA) e à seguir foi mergulhada nesta mesma solução, na qual adicionou-se a cafeína ou eugenol. Na presença de eugenol (5 mM), após a obtenção do platô da força desenvolvida, a fibra retornou para a Sol R (pCa 8,5, 5 mM de EGTA). A contratura cafeínica foi transiente não necessitando, para o seu relaxamento, a exposição da fibra a Sol R. A obtenção da força máxima foi realizada sem o prévio carregamento do retículo sarcoplasmático com cálcio. Calibração: a barra vertical representa a força em N e a horizontal o tempo em segundos. Em **b**: Representação gráfica dos valores de força de contração muscular desenvolvida por preparações expostas à cafeína (30 mM), eugenol (1, 5 ou 10 mM), expressos em porcentagem da força máxima, obtida por ativação da fibra em Sol FM. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  o erro padrão.

**A****B**

**Figura 15-** Efeito da procaína (10 mM) na contratura induzida pelo eugenol (5 ou 10 mM) ou cafeína (30 mM) em fibra permeabilizada com saponina. Em **a**: Registro original de um experimento típico mostrando a contratura induzida pela cafeína, como consequência da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. A preparação foi mantida inicialmente em Sol R e à seguir a mesma teve seu retículo carregado com íons cálcio, graças a transferência da fibra para a Sol C, onde permaneceu por dois minutos. Após o carregamento, a célula foi transferida para a Sol L e posteriormente foi induzido a liberação de cálcio do RS através da passagem da fibra pela Sol L, contendo 30 mM de cafeína. Após o relaxamento da fibra, obtido pela transferência desta para a Sol R, obteve-se a ativação máxima do sistema contrátil, através da passagem desta pela Sol FM. Na seqüência, o retículo sarcoplasmático foi carregado novamente em solução contendo pCa 6.4 e foi testado o efeito do eugenol (5 ou 10 mM) na liberação de cálcio do RS (para cada concentração de eugenol testada foi repetido o protocolo controle). Por último a preparação foi incubada com procaína (10 mM), por um período de cinco minutos e transferida para câmara contendo procaína na presença de eugenol ou cafeína. Calibração: a barra vertical representa a força em N e a horizontal o tempo em segundos. Em **b**: Representação gráfica dos valores de força de contração muscular desenvolvida por preparações expostas à cafeína ou eugenol, e o efeito da procaína sobre estas contraturas, expressos em percentagem da força máxima, obtida por ativação da fibra em Sol FM. As barras verticais representam o erro padrão da média.



estes valores para  $2,70 \pm 0,97$  e  $8,45 \pm 4,41$ , respectivamente. A procaína reduziu a força desenvolvida pela exposição à cafeína de  $90,51 \pm 3,22$  para  $7,78 \pm 1,12$ .

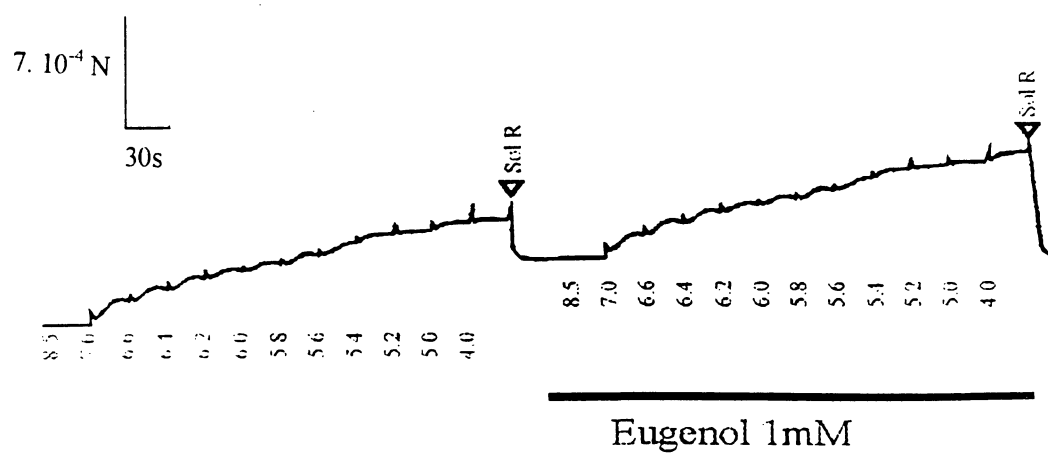
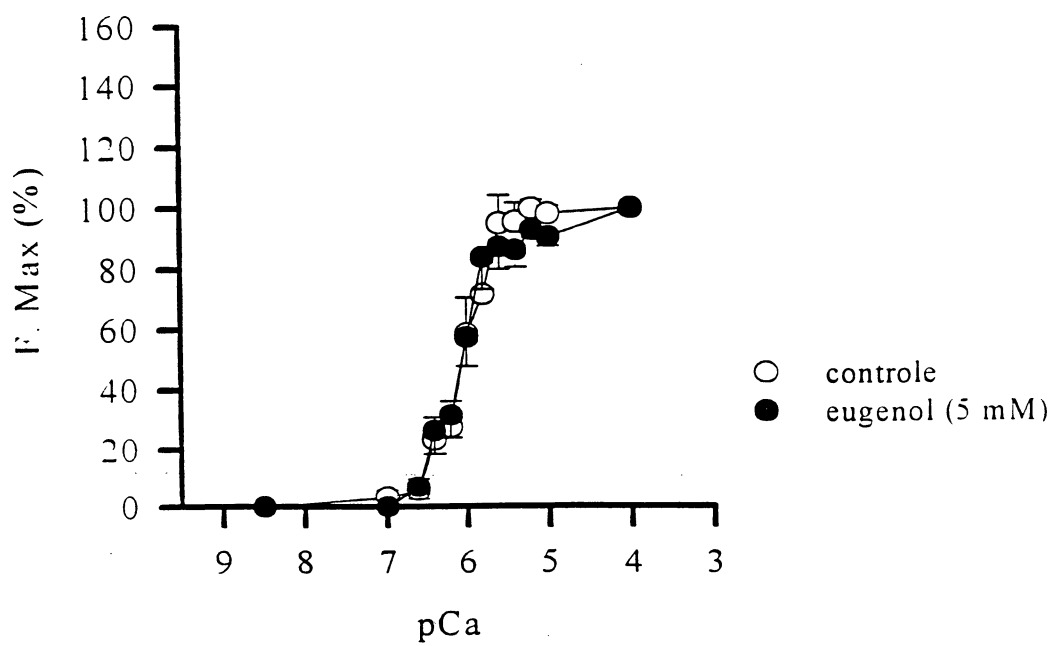
### 3.12. Efeito do eugenol (5 mM) na relação força/[Ca<sup>2+</sup>] em fibra permeabilizada com triton X 100

Como está demonstrado na figura 12, a presença de 5 mM de eugenol em fibra permeabilizada com Triton X-100 não promoveu alteração da sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio. A concentração de íons cálcio necessária para produzir 50% da ativação máxima da fibra (pCa 50% ou K) foi de  $1,11.10^{-6} \pm 3,07.10^{-7}$  M na ausência e  $9,85.10^{-7} \pm 2,05.10^{-7}$  M na presença de 5 mM eugenol. Esta diferença não foi estatisticamente significativa. O coeficiente de Hill (N), o qual determina o grau de inclinação da curva foi de  $3,26 \pm 0,88$  na ausência e  $3,07 \pm 0,71$  na presença de 5 mM de eugenol. Estes dados estão representados graficamente no painel b da figura 16, onde a ordenada representa os valores de força obtidos em relação a força máxima (pCa 4.0) e a abcissa os valores de pCa.

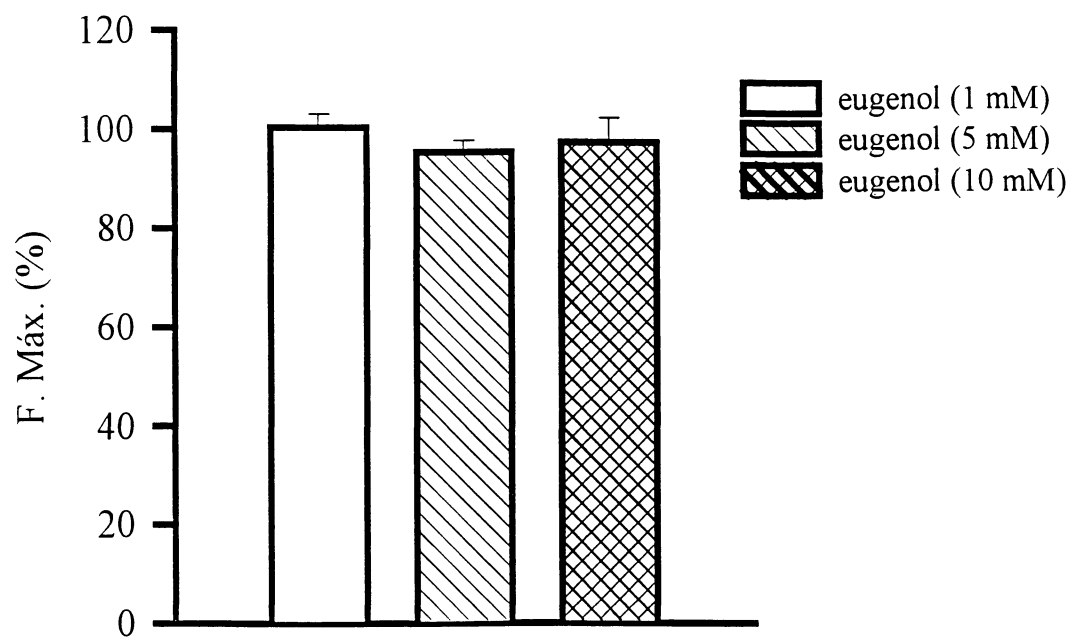
### 3.13. Efeito do eugenol (1, 5 e 10 mM) na força máxima induzida em fibra permeabilizada com Triton X-100

Conforme demonstrado na figura 16 a adição de 5 mM de eugenol a solução contendo concentrações crescentes de íon cálcio, não produziu alteração na sensibilidade do sistema contrátil a este íon. Variando-se a concentração de eugenol (1, 5 e 10 mM), quando acrescentado na solução com pCa 4.0, também não provocou alteração significativa na força máxima

**Figura 16-** Efeito do eugenol (5 mM) na relação força/[Ca<sup>2+</sup>] em fibra permeabilizada com Triton X-100. Em **a**: Registro original de um experimento típico, mostrando a ativação do sistema contrátil obtido pela preparação por soluções contendo concentrações crescentes de íons cálcio na ausência e na presença de eugenol. A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta a 5 mM de eugenol. Calibração: a barra vertical representa a força em N e a horizontal o tempo em segundos. Em **b**: Representação gráfica dos dados obtidos conforme descrito em **a**. Os círculos aberto e fechado representam, respectivamente, os resultados obtidos, na ausência e na presença de 5 mM de eugenol. As barras verticais representam o erro padrão da média e a ausência destas indica que o erro padrão foi menor do que a dimensão do símbolo. Os valores de K e N na ausência de eugenol foram de  $1,11 \cdot 10^{-6} \pm 3,07 \cdot 10^{-7}$  M e  $3,07 \pm 0,71$ , respectivamente. Na presença de 5 mM de eugenol obteve-se um valor de K igual a  $9,85 \cdot 10^{-7} \pm 2,05 \cdot 10^{-7}$  M e o valor de N igual a  $3,26 \pm 0,88$ .

**A****B**

**Figura 17-** Efeito do eugenol (1, 5 ou 10 mM) na força máxima induzida em fibra permeabilizada com Triton X-100. O gráfico expressa os valores, em percentual, daqueles obtidos na ausência de eugenol. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão.



produzida pela fibra. Os valores de força máxima obtidos na presença de 1, 5 e 10 mM de eugenol foram respectivamente de  $100,48 \pm 2,61$ ,  $95,53 \pm 2,32$  e  $97,42 \pm 4,85$ , daqueles valores obtidos na ausência deste composto.

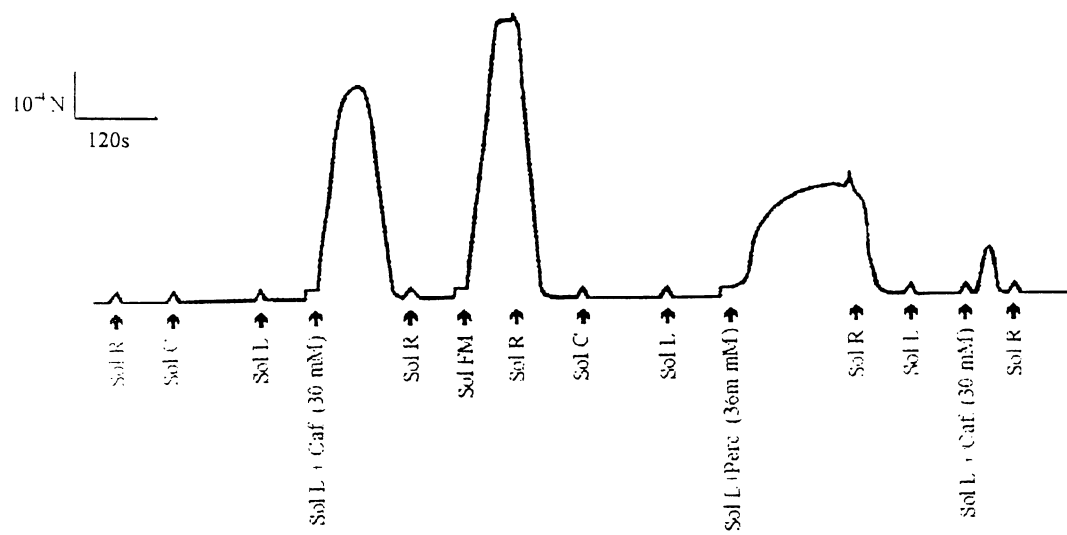
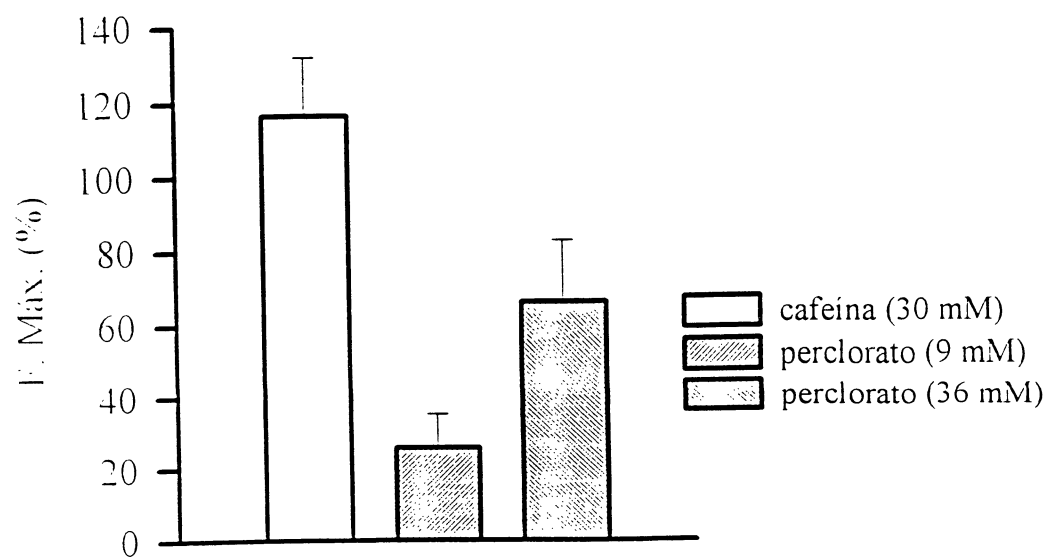
### 3.14. Efeito do perclorato (9 e 36 mM) na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina

Como demonstrado em vários estudos, o perclorato é um ânion muito utilizado para se estudar o processo de acoplamento excitação-contração, em especial a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (FRUEN *et al.*, 1994a; CSERNOCH *et al.*, 1999). Utilizando-se protocolo semelhante ao descrito para o eugenol (item 3.11), avaliou-se o efeito de 9 e 36 mM de perclorato na liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. Após o retículo sarcoplasmático ter sido carregado com íons  $\text{Ca}^{2+}$ , a exposição da fibra a Sol L contendo perclorato (9 e 36 mM) desenvolveu  $33,48 \pm 15,29$  e  $58,56 \pm 11,56$ , respectivamente, da força máxima. Com o emprego da cafeína (30 mM) a força desenvolvida pelas fibras musculares atingiram  $97,56 \pm 5,30$  da força máxima.

### 3.15. Efeito da procaína (10 mM) na contratatura induzida pelo perclorato (36 mM) em fibra permeabilizada com saponina

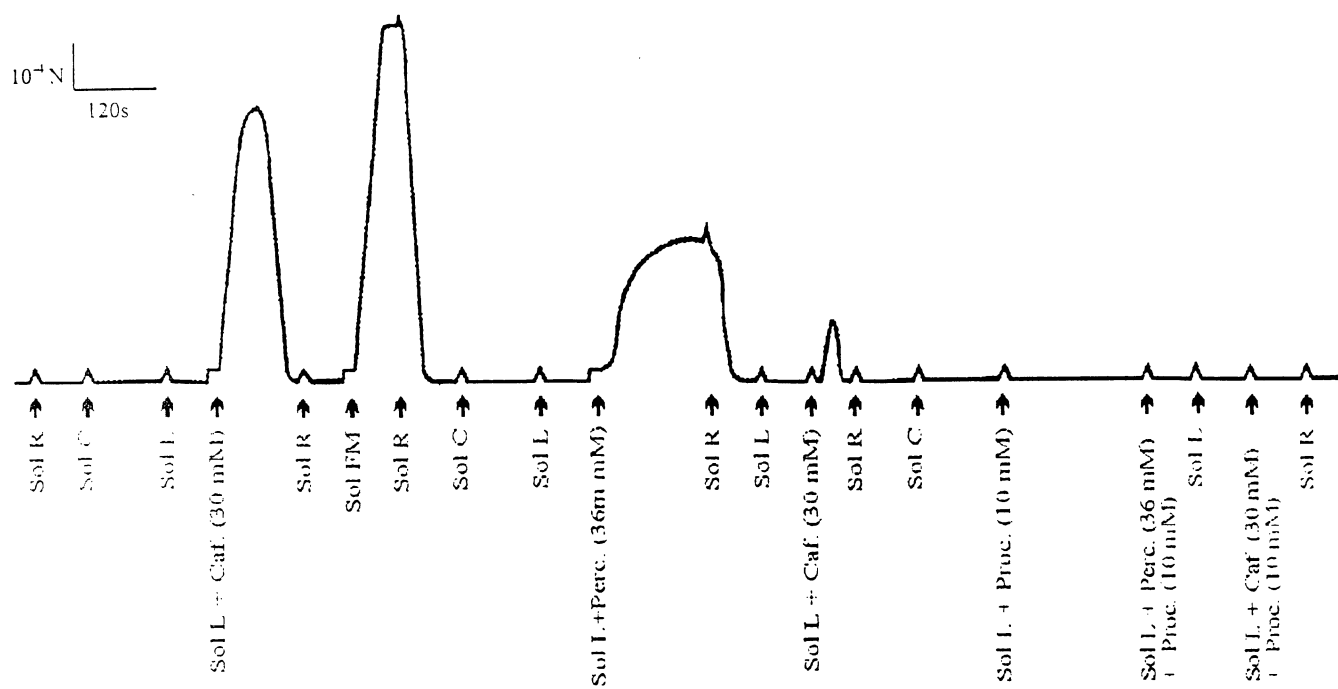
Novamente utilizou-se de um bloqueador de canais de cálcio do retículo sarcoplasmático (procaína), para verificar se a força muscular produzida quando as preparações foram submetidas à soluções contendo perclorato, foi proveniente de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Para tal, após o retículo sarcoplasmático ter sido carregado com cálcio, a preparação foi exposta, durante cinco minutos à Sol L, na qual adicionou-se procaína (10 mM).

**Figura 18-** Efeito do perclorato (9 ou 36 mM) na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina. Em **a**: Registro original de um experimento, demonstrando a ativação do sistema contrátil, induzida pela liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, quando da utilização de perclorato (9 ou 36 mM), cafeína ou pela exposição da fibra à Sol FM (pCa 4,0). O protocolo empregado, foi similar ao descrito para a figura 14 onde fez-se a substituição do eugenol pelo perclorato. Na presença de perclorato, após a obtenção do platô da força desenvolvida, a fibra retornou para a Sol R (pCa 8,5, 5 mM de EGTA). A contratura cafeínica foi transiente não necessitando, para o seu relaxamento, a exposição da fibra a Sol R. A obtenção da força máxima foi realizada sem o prévio carregamento do retículo sarcoplasmático com cálcio. Calibração: a barra vertical representa a força em N e a horizontal o tempo em segundos. Em **b**: Representação gráfica dos valores de força de contração muscular desenvolvida por preparações expostas à cafeína (30 mM) ou perclorato (9 ou 36 mM), expressos em porcentagem da força máxima, obtida por ativação da fibra em Sol FM. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  o erro padrão.

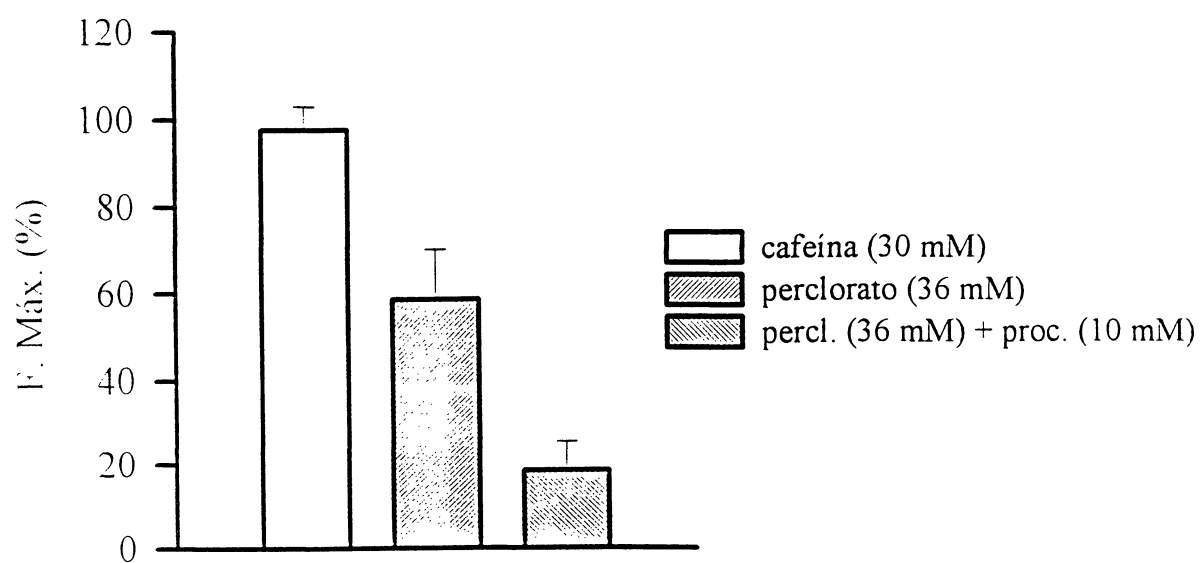
**A****B**

**Figura 19-** Efeito da procaína (10 mM) na contratura induzida pelo perclorato (36 mM) ou cafeína, em fibra permeabilizada com saponina. Em **a**: Registro original de um experimento típico, mostrando o efeito contraturante do perclorato e o bloqueio desta contratura pela procaína. O protocolo empregado é idêntico ao descrito na figura 15. Após o retículo ter sido carregado com cálcio (pCa 6.4), a adição do perclorato ou da cafeína à Sol L, induziu a contração da fibra muscular. A prévia incubação da preparação com procaína (5min), após ter sido feito o carregamento do retículo, bloqueou a contração induzida pelo perclorato ou cafeína. Calibração: a barra vertical representa a força em N e a horizontal o tempo em segundos. Em **b**: representação gráfica dos valores de força contrátil induzidos pela cafeína (30mM), perclorato (36 mM) e de cada um destes compostos na presença de procaína, em fibras permeabilizadas com saponina. Os dados estão expressos como valores percentuais da força obtida por ativação máxima do sistema contrátil. Os dados estão expressos como média  $\pm$  o erro padrão.

A



B



Passado o tempo de incubação com procaína, a fibra foi transferida para a Sol L na presença de perclorato (36 mM) e procaína. Idêntico protocolo foi realizado com a cafeína. Os dados obtidos demonstram que a procaína bloqueia a contração induzida pela cafeína ou pelo perclorato. Os valores de força muscular (em percentual da força máxima) obtidos quando a fibra foi transferida para solução contendo 36 mM de perclorato e após a incubação com a procaína, foram de  $58,56 \pm 11,56$  e  $18,34 \pm 6,95$ , respectivamente.

### 3.16. Efeito do perclorato (10 mM) na relação força/[Ca<sup>2+</sup>] em fibra permeabilizada com Triton X-100

Os resultados obtidos com músculo intacto e fibra isolada permeabilizada com saponina, demonstram que quando o músculo intacto ou a fibra isolada são submetidos a soluções contendo perclorato, ocorre um incremento no grau de encurtamento ou na força produzida pelos mesmos. Tais efeitos poderiam ser decorrentes de uma ação direta do perclorato no sistema contrátil, aumentando a sensibilidade do mesmo ao íon cálcio. Para testarmos esta hipótese avaliou-se os efeitos do perclorato na relação força/[Ca<sup>2+</sup>] em preparações permeabilizadas com Triton X 100. Como demonstrado na figura 20, o perclorato deslocou a curva força/[Ca<sup>2+</sup>] para a esquerda, indicando que a presença deste ânion aumentou a sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio.

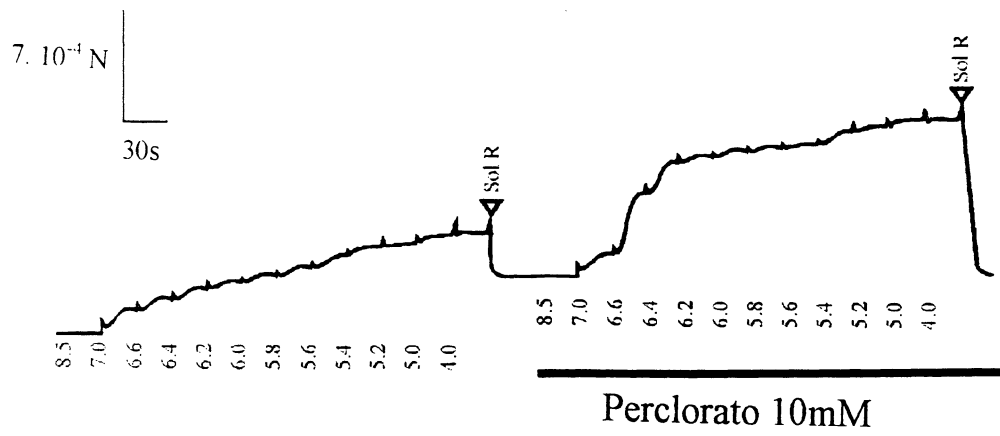
### 3.17. Efeito da interação do íon perclorato (9 mM) e eugenol (1 mM) na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina

Os resultados descritos acima demonstram que o perclorato ou eugenol, induz liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Assim, após o retículo sarcoplasmático ter sido carregado com cálcio, as preparações foram submetidas a Sol L contendo 1 mM de eugenol, na ausência e na presença de perclorato (9 mM). Como em músculo intacto o eugenol promove contração

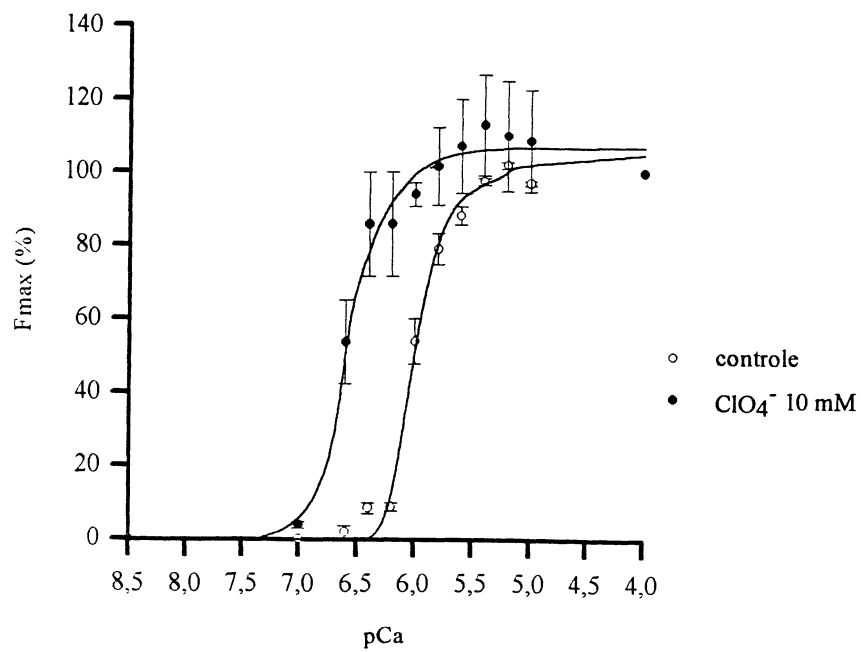
muscular e cujo efeito é potencializado pela cafeína (vide figura 7), utilizamos o perclorato, uma substância que também induz contração muscular, com o objetivo de compreender o mecanismo envolvido nesta ação contraturante. Assim, após o retículo sarcoplasmático ter sido carregado com íons cálcio (vide em materiais e métodos, ítem 2.3.1.), as preparações foram transferidas para a Sol L, contendo eugenol ou perclorato isoladamente ou em combinação. Ao final de cada experimento realizou-se uma contratura cafeínica (30 mM) (sem o carregamento prévio do retículo) com a finalidade de se verificar a quantidade de íons cálcio liberado do retículo sarcoplasmático pelo eugenol, perclorato ou ambos. Os valores de força muscular obtidos na presença de 1 mM de eugenol foi de  $64,20 \pm 6,67$  e na presença de 9 mM de perclorato foi de  $25,78 \pm 9,62$ . Na presença de ambos os compostos a força desenvolvida foi de  $80,72 \pm 14,77$  em relação a força máxima induzida por  $10^{-4}$  M de cálcio. Com o emprego da cafeína (30 mM), a força desenvolvida pelas fibras musculares atingiram  $116,35 \pm 15,40$  da força máxima.

**Figura 20-** Efeito do perclorato (10 mM) na relação força/[Ca<sup>2+</sup>] em fibra permeabilizada com Triton X-100. Em **a**: Registro original de um experimento típico, demonstrando a ativação do sistema contrátil com concentrações crescentes de íons cálcio na ausência (primeira curva) e na presença de perclorato (segunda curva). O protocolo empregado é idêntico ao descrito na figura 16. A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta a 10 mM de perclorato, conforme indicado na figura. Calibração: a barra vertical representa a força em N e a horizontal o tempo em segundos. Em **b**: Representação gráfica dos dados obtidos conforme protocolo demonstrado em a. Os círculos abertos e fechados representam, respectivamente os resultados obtidos, na ausência e na presença de 10 mM de perclorato. As barras verticais representam o erro padrão da média e a ausência destas indica que o erro padrão foi menor do que a dimensão do símbolo.

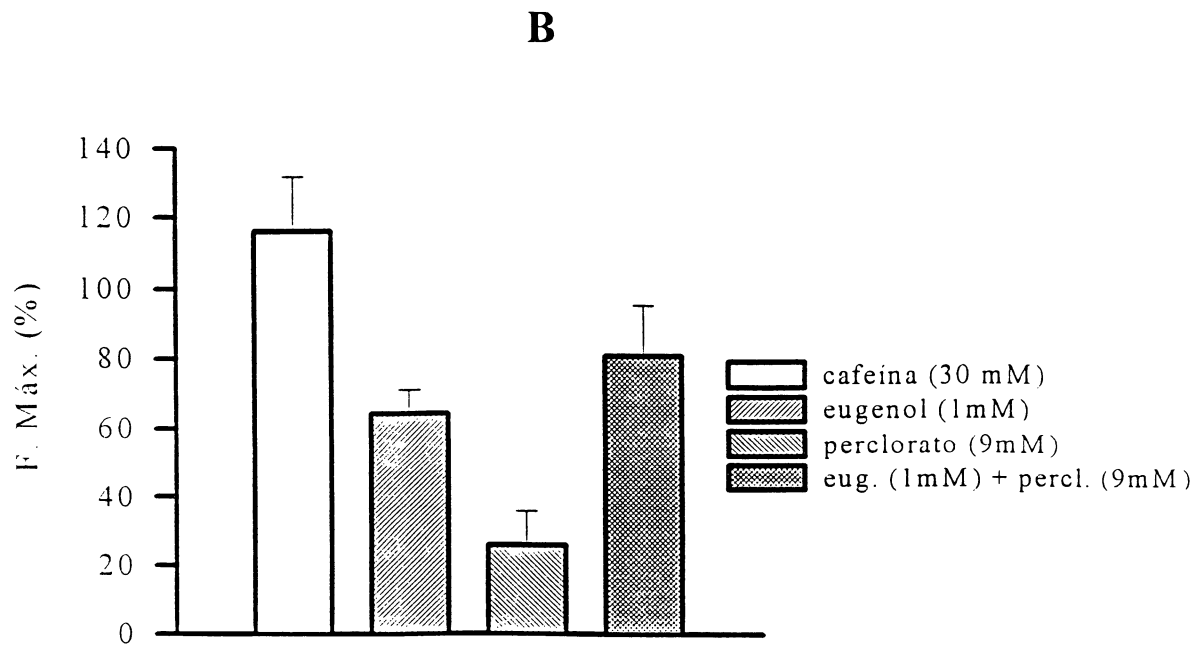
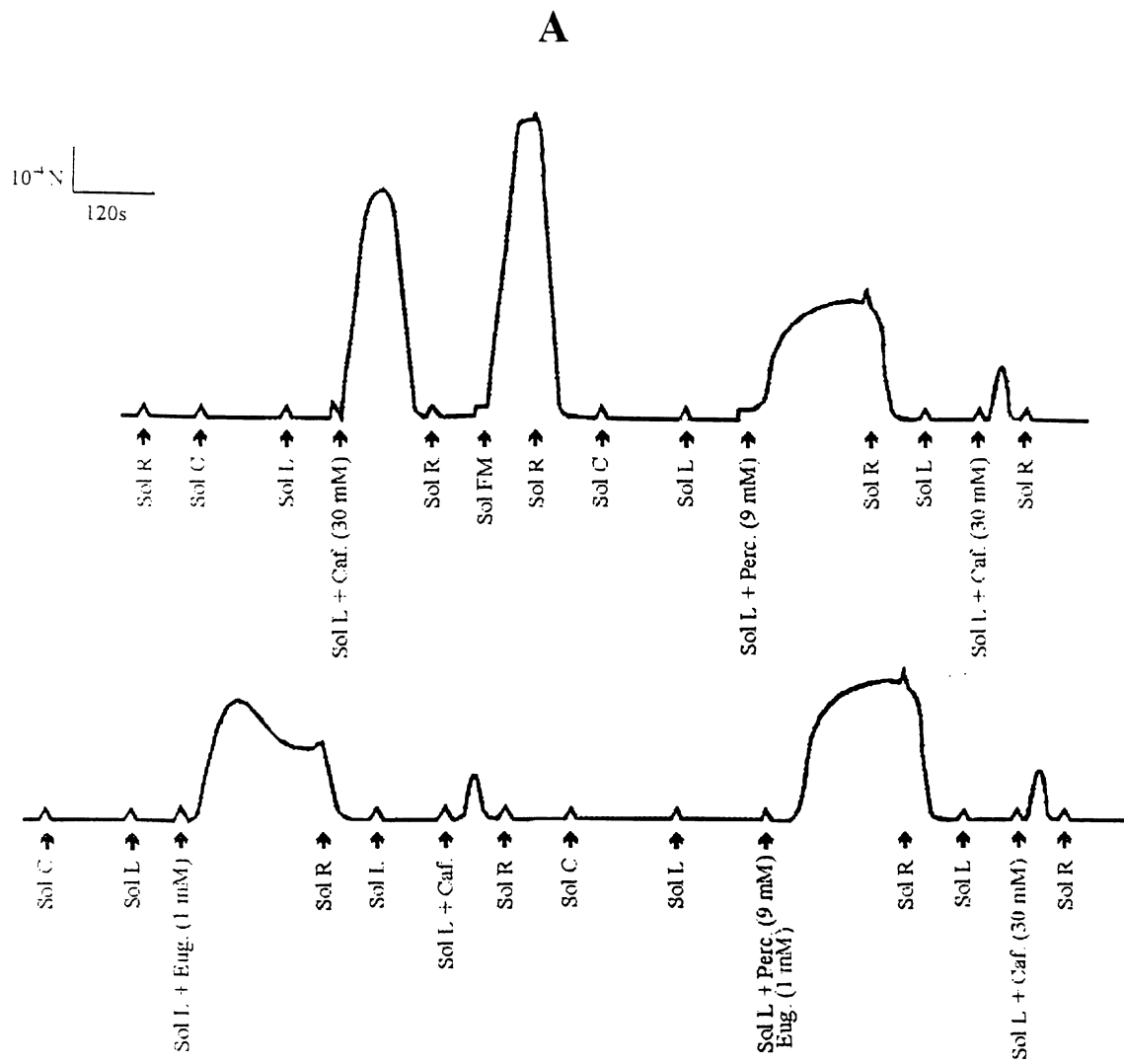
A



B



**Figura 21-** Efeito da interação do íon perclorato (9 mM) e eugenol (1 mM) na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em fibra permeabilizada com saponina. Em **a**: Registro original de um experimento típico mostrando que após o carregamento do retículo sarcoplasmático com íons cálcio, a cafeína, o eugenol, o perclorato e o perclorato na presença de eugenol induziram a contração da preparação. Para testar o efeito na liberação de cálcio, foi realizado o carregamento prévio do retículo sarcoplasmático com esse. O protocolo utilizado para carregamento e liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático foi idêntico ao descrito na figura 14. O símbolo (↑) representa os momentos de transferência da preparação para as soluções conforme indicado no painel a. Calibração: a barra vertical representa a força em N e a horizontal o tempo em segundos. Em **b**: Representação gráfica dos dados obtidos conforme descrito em a. Os valores de força obtidos em cada condição experimental estão normalizados para aqueles obtidos pela ativação máxima do sistema contrátil e estão expressos como a média ± o erro padrão.



#### 4. DISCUSSÃO

A utilização de compostos que interferem com o AEC tem sido empregados com o objetivo de elucidar este mecanismo de transdução de sinal (ASHLEY *et al.*, 1991, RIOS & PIZARRO, 1991). Neste trabalho, empregou-se uma série de compostos com o mesmo objetivo. Em músculo intacto verificou-se que o eugenol nas concentrações entre 0,1 à 3,0 mM bloqueou de forma dose dependente a contratura induzida pela despolarização da membrana citoplasmática (Figura 5). Tal efeito poderia ser decorrente do bloqueio de canais de potássio, da transdução do sinal elétrico da membrana citoplasmática dos túbulos T para os receptores existentes na membrana da cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (RYR), da liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático (por um efeito direto nos RYR), bloqueio da ativação das proteínas do sistema contrátil ou de uma combinação destes efeitos. Contudo, nossos dados demonstram que o bloqueio dos canais de potássio é pouco provável visto que os valores do potencial transmembrana não foram afetados quando da presença do eugenol (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994), quer em preparações mantidas em solução contendo 4 ou 100 mM de  $K^+$ . Também é pouco provável que o bloqueio da contratura potássica induzida pelo eugenol seja decorrente do bloqueio da liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, visto que nas concentrações de eugenol que bloquearam a contratura potássica, este composto potencializou os efeitos da cafeína (Figura 7). Estes dados sugerem fortemente que o eugenol não bloqueia a contratura potássica por bloquear a liberação de cálcio do R.S. Por outro lado, o bloqueio da contratura potássica poderia ocorrer se este composto bloqueasse a interação dos filamentos grossos com os finos. Esta possibilidade é contudo também pouco provável visto que tanto em preparações permeabilizadas com saponina quanto em preparações permeabilizadas com triton X 100, não houve alteração da resposta contrátil induzida pelo cálcio na presença de eugenol (Figuras 14 e 17). Os efeitos do

eugenol em preparações intactas e permeabilizadas com saponina demonstram que este composto induz contração quando empregado em altas concentrações (Figuras 6 e 14). Assim sendo, o bloqueio da contratura potássica induzida pelo eugenol não pode ser atribuída ao bloqueio da interação da miosina com a actina. Outra possibilidade para se explicar o bloqueio da contratura potássica induzida pelo eugenol, seria de que este composto poderia estar provocando a desorganização da estrutura miofibrilar das células musculares. Contudo isto também é pouco provável, visto que o bloqueio da contratura potássica foi reversível, mesmo quando se empregou altas concentrações deste composto. Resta portanto, dentre as várias possibilidades, a de que o eugenol possa interferir com a transdução do sinal elétrico, a partir da membrana do sistema tubular transverso para o retículo sarcoplasmático. Este mecanismo tem sido amplamente estudado. Acredita-se que o acoplamento mecânico entre os receptores dihidropiridínicos presentes na membrana do sistema tubular transverso com os receptores RYR na membrana da cisterna terminal do retículo sarcoplasmático seja feita de forma mecânica. O movimento de carga transmembrana que ocorre no receptor dihidropiridínico como consequência da despolarização da membrana do sistema tubular transverso promove a abertura dos canais de cálcio do R.S e assim se desencadeia a contração muscular (SCHNEIDER & CHANDLER, 1973; RIOS & PIZARRO, 1991). A possibilidade de que o eugenol venha a bloquear a transdução desse sinal não pode portanto ser excluída. Nesse trabalho não foi realizado a medida do movimento de carga transmembrana dos receptores dihidropiridínico, não sendo portanto possível excluir tal possibilidade. Tem sido demonstrado que o ânion perclorato potencializa o processo de acoplamento excitação contração em músculo esquelético, deslocando a relação do potencial transmembrana do sistema tubular transverso/força (ou movimento transmembrana de cargas) para a esquerda (DULHUNTY *et al.*, 1992; CSERNOCH *et al.*, 1999). Nossos dados confirmam àqueles existentes na literatura. A pré incubação de preparações com perclorato (2

mM) e a subsequente substituição da solução de Ringer contendo 4 para uma solução contendo 40, 80 ou 100 mM de potássio potencializou a contratatura induzida por essas concentrações de potássio (Figura 8), deslocando assim a curva encurtamento muscular/concentração extracelular de  $K^+$  para a esquerda. Resultado similar foi obtido por DULHUNTY (DULHUNTY *et al.*, 1992). Considerando que o perclorato é uma substância que potencializa a interação dos receptores DHPR/RYR, estes dados também sugerem que o efeito do eugenol, provavelmente ocorre no passo de transdução do sinal dos receptores dihidropiridínicos para o retículo sarcoplasmático. A ausência de efeitos do perclorato, mesmo quando utilizado altas concentrações deste ânion em solução contendo 100 mM de potássio, sugerem que a potencialização do encurtamento muscular induzido pelo mesmo, seria dependente do valor de voltagem transmembrana e não de um efeito intracelular. Assim sendo é pouco provável que a ação potencializadora do perclorato nas contrações induzidas pelo incremento da concentração extracelular de  $K^+$ , seja decorrente de um efeito a nível do retículo sarcoplasmático. Da mesma forma se o efeito potencializador da contratatura induzida pelo perclorato fosse semelhante ao efeito da cafeína, esperaríamos uma potencialização quando da presença deste ânion com o eugenol. Tal fenômeno não ocorreu quando as preparações foram mantidas em solução contendo 100 mM de  $K^+$  (Figura 9). A contração muscular induzida pelo perclorato somente foi observado em solução contendo 4 mM de potássio o que sugere que a ação deste ânion depende do estado prévio do potencial transmembrana e por consequência, do estado dos receptores dihidropiridínicos. Apesar de não termos mensurado o potencial transmembrana nestes dois grupos de experimentos é razoável supor que com o incremento da concentração extracelular de potássio de 4 para 100 mM, o valor do potencial de membrana nessa concentração de  $K^+$  é suficiente para inativar os receptores dihidropiridínicos (OBA *et al.*, 1997), e assim bloquear ambas, a contratatura induzida pelo perclorato e a potencialização da mesma pelo eugenol. A

contratura induzida por 40 mM de  $K^+$  e na presença de 2 mM de perclorato foi bloqueada pelo eugenol de forma dose dependente (Figura 12) e em idêntica faixa de concentração a qual induziu bloqueio da contratura induzida por 100 mM de  $K^+$  (Figura 5). Por outro lado tal efeito potencializador da contração muscular induzido pelo eugenol na presença de perclorato foi observado em preparações mantidas em concentração extracelular de 4 mM de  $K^+$  (Figura 13). Estes resultados são aparentemente contraditórios visto que o eugenol bloqueou a potencialização da contratura potássica (40 mM). Comparando-se as concentrações de perclorato necessárias a contração muscular em 4 mM de potássio na presença ou ausência de eugenol, verifica-se que as mesmas são muito superiores (cerca de 40 mM) daquelas empregadas quando do incremento da concentração extracelular de  $K^+$  (2 mM). Assim sendo, novos estudos são necessários para que compreenda-se melhor tais efeitos. Considerando contudo que concentrações de eugenol suficientes para bloquear a contratura potássica (Figura 5) potencializaram o efeito da cafeína é razoável supor que a potencialização do efeito do perclorato pode ser decorrente de um efeito de ambas as substâncias, uma ao nível dos receptores DHP (o perclorato) e outro ao nível dos receptores RYR (o eugenol). Resultados semelhantes foram observados por Oba (OBA et al., 1997). Neste estudo estes autores verificaram que o efeito da cafeína foi potencializado pelo perclorato. Estes autores atribuíram tais ações a ativação dos receptores DHP induzidos pelo perclorato e a potencialização do processo de acoplamento-excitação contração induzido por este ânion.

Em músculo esquelético a principal fonte de íons cálcio necessária ao desencadeamento do processo contrátil é a do retículo sarcoplasmático (RIOS & PIZARRO, 1991). Poderíamos esperar contudo, que o aumento na condutância de canais de cálcio induzido pelo perclorato poderia ser um mecanismo pelo qual este ânion poderia estar atuando. Os experimentos nos quais o íon cálcio foi omitido da composição da solução nutritora e na qual se acrescentou 1 mM

de EGTA com a finalidade de se reduzir ainda mais a concentração extracelular deste íon, não aboliu o efeito contraturante do perclorato, conforme demonstrado na figura 10. Assim, é pouco provável que tal efeito seja decorrente de um incremento da condutância de membrana ao íon cálcio, como também sugerido por (DULHUNTY *et al.*, 1992; GYÖRKE & PALADE, 1992; OBA *et al.*, 1997).

O eugenol quando utilizado em altas concentrações (acima de 3 mM), induziu contração muscular (Figura 6). Tal efeito poderia ser resultado de um ou da combinação de vários fatores: despolarização do sarcolema, potencialização do processo de acoplamento excitação-contração, abertura dos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático por um efeito direto nos mesmos ou ativação direta do sistema contrátil. Dados existentes na literatura sugerem que é pouco provável que o eugenol pudesse promover a despolarização do sarcolema, visto que tanto em preparações mantidas em 4 ou 60 mM de  $K^+$  o eugenol pouco modificou os valores do potencial de membrana medidos com a técnica de microeletrodo intracelular (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994). Da mesma forma, o efeito contracturante do eugenol foi observado em preparações mantidas em solução contendo 100 mM de  $K^+$  extracelular (Figura 6). Como nesta concentração de potássio extracelular as membranas das células musculares encontram-se despolarizadas e canais tanto de cálcio quanto de sódio encontram-se inativados é pouco provável que a contração muscular induzida pelo eugenol seja decorrente de alterações da condutância de membrana a estes íons. Dados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram também observados por LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994.

A possibilidade de que o eugenol possa induzir contração por atuar diretamente no sistema contrátil também pode ser afastada, visto que em preparações permeabilizadas com o uso de saponina ou Triton X-100, não foi observado contração muscular, quando as preparações foram mantidas na ausência de íons cálcio (Figuras 14 e 17). Em fibras permeabilizadas com o

uso de saponina, a contração induzida pelo eugenol foi transitória, e somente foi observada quando as preparações tiveram o seu retículo sarcoplasmático carregadas com o íon cálcio (Figura 14). Caso o eugenol estivesse atuando diretamente nas proteínas do sistema contrátil, estas contraturas não seriam fásicas, tais efeitos não foram observados. Os resultados obtidos por Leal-Cardoso (LEAL-CARDOSO *et al*, 1994) sugerem que a contração muscular induzidas pelo eugenol, são provavelmente ocasionadas por uma ação direta deste composto no retículo sarcoplasmático. Estes autores verificaram que a prévia incubação de músculo sartório de sapo com a procaina foi eficiente em bloquear a contratura induzida pelo eugenol. O efeito contraturante do eugenol é provavelmente decorrente da liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático visto que em preparações permeabilizadas com o uso de saponina e que tiveram seu retículo sarcoplasmático carregados com o íon cálcio, este composto foi capaz de induzir contração muscular ((Figura 14). Como pode ser observado na figura 14, após a liberação de íons cálcio induzido pelo eugenol, a exposição da preparação à cafeína (sem o prévio carregamento do retículo sarcoplasmático com íons cálcio) não se verificou a contração das fibras musculares. Isto demonstra que o eugenol promoveu a depleção de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. As contrações musculares obtidas em preparações permeabilizadas com o uso de saponina foram bloqueadas pela procaina, uma substância que bloqueia a liberação de íons cálcio do RS (Figura 15) (GARCÍA & SCHNEIDER, 1995). Estes dados reforçam a hipótese de que o eugenol possa estar atuando ao nível dos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático, aumentando a condutância dos mesmos. Como pode ser verificado na figura 14, a contração muscular induzida pelo eugenol apresenta o curso temporal diferente da contração promovida pela cafeína. Enquanto que a cafeína induz a contração a qual é seguida pelo relaxamento, o relaxamento das contrações induzidas pelo eugenol, aparentemente tem 2 fases: uma fase de relaxamento semelhante ao da cafeína e outra cujo relaxamento é mais demorado (Figura 14, painel a). O

relaxamento muscular ocorre como consequência da difusão do cálcio liberado para a solução do espaço extrafilamentar e também pela recaptção de cálcio pela bomba de cálcio presente na membrana longitudinal do retículo sarcoplasmático (WOLOSKER *et al.*, 1992). Assim, uma substância que venha bloquear a recaptção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático produzirá um relaxamento muscular mais lento. Neste trabalho não investigou-se os efeitos do eugenol nos mecanimos envolvidos na recaptção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Outros estudos serão necessários para se esclarecer tais efeitos.

Neste trabalho foi investigado também se o efeito do eugenol e do perclorato isoladamente e em combinação pudesse ser decorrente de um efeito direto no sistema contrátil. Para tal foi empregada a técnica de fibra permeabilizadas com o uso de Triton X-100. Com uso desta técnica é possível estudar os efeitos de substâncias ao nível do sistema contrátil, visto que este detergente não iônico solubiliza todos os elementos membranosos da célula, mas mantém íntegro e funcional o sistema contrátil. Neste caso a ativação do sistema contrátil é obtido adicionando-se à solução diferentes concentrações de íon cálcio. Assim é possível se verificar o grau de cooperatividade das proteínas do sistema contrátil bem como a sensibilidade do mesmo ao íon cálcio. Enquanto que a cooperatividade do sistema é dado pela inclinação da curva força versus concentração de íons cálcio, a quantidade de cálcio necessária para se obter 50 % da força máxima nos fornece a sensibilidade do sistema contrátil a este íon. A exposição do sistema contrátil ao eugenol não alterou a sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio ou a cooperatividade do mesmo (Figura 16). Estes dados sugerem que a afinidade da troponina C pelo cálcio não foi alterada pelo eugenol. A interação da cabeça da miosina, os outros fatores relacionados com a cooperatividade do sistema troponina-tropomiosina e os estados de forte ligação da miosina com a actina também não foram modificados. Tendo como base estes dados, a ativação do sistema contrátil induzido por altas concentração de eugenol em músculo intacto

não pode ser atribuído ao aumento da sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio. Da mesma forma, o bloqueio da contratura potássica induzida pelo eugenol não pode ser decorrente do bloqueio da interação acto-miosina ou da redução da sensibilidade do sistema contrátil a este íon. Portanto o bloqueio ou a ativação do sistema contrátil induzido pelo eugenol em músculo intacto não pode ser devido a modificações na sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio porque estes efeitos seriam profundamente contraditórios por si só.

Em fibras permeabilizadas com saponina e que tiveram o retículo sarcoplasmático carregados com íon cálcio, o íon perclorato induziu contração muscular por induzir provavelmente a liberação deste íon desta organela (Figura 19). Como nestas perparações o potencial transmembrana do sistema tubular transverso não é mantido, pois a saponina ao reagir com grupamentos de colesterol da membrana, faz com que a mesma perca suas propriedades seletivas (LAUNIKOS, & STEPHENSON, 1997), a possibilidade de que o íon perclorato venha a ativar os receptores dihidropiridínicos é pouco provável. Assim, podemos sugerir que este ânion venha atuar no receptor rianodínico. Efeitos semelhantes foram obtidos em estudos onde se empregaram vesículas isoladas de cisterna terminal de retículo sarcoplasmático (YANO *et al.*, 1995). Estes autores verificaram que o ânion perclorato, quando empregado em concentrações acima de 10 mM, foi capaz de induzir a liberação de íons cálcio. Verificou-se também que em RYR incorporados em bicamada lipídica o perclorato aumentou a probabilidade de abertura dos mesmos. Estes dados sugerem que este ânion possa atuar diretamente no retículo sarcoplasmático. Visto que a interação dos receptores DHP/RYR é realizada em ambas as direções (BERS & FILL, 1998; MARXS *et al.*, 1998; CSERNOCH *et al.*, 1999), a possibilidade de o perclorato atuar diretamente nos receptores RYR não pode ser afastada.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que em músculo esquelético intacto de anfíbio:

- 1) O eugenol induz bloqueio da contratura potássica provavelmente por bloquear a interação do receptores dihidropiridínico presentes no sistema tubular transverso com os receptores raionadínicos presentes na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático;
- 2) O eugenol induz contração muscular por induzir a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático;
- 3) O euganol potencializou ou inibiu a contratura induzida por perclorato por afetar o processo de acoplamento excitação-contração em passos que envolvem a transdução do sinal da membrana do sistema tubular transverso e/ou do retículo sarcoplasmático;
- 4) A contratura muscular induzida pelo ânion perclorato é dependente do potencial de membrana e independe do influxo de íons cálcio na membrana celular.

Em preparações desmembranadas com o uso de saponina ou de triton X 100, verificou-se que:

- 1) O eugenol induz a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático indicando que a contração muscular observada em músculo intacto é decorrente dessa ação;

- 2) O eugenol não alterou a sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio ou a força máxima, sugerindo que seu efeito contracturante não é devido ao efeito no sistema contrátil;
- 3) O íon perclorato promoveu contração de fibras permeabilizadas com o uso de saponina, provavelmente por induzir a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático;
- 4) O aumento da sensibilidade ao íon cálcio induzido pelo perclorato em fibras permeabilizadas pelo perclorato pode contribuir para os efeitos observados em músculo intacto.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALBUQUERQUE, A., C., XAVIER-NETO, J., DINIZ-FILHO, J., VIANA, G. S. B., LEAL-CARDOSO, J. H. (1984). Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, estragole and anethole on nerve and skeletal muscle. *Rev. Med. Univ. Fed. Ceará* 24 (2), 19-27, Fortaleza.
- ALBUQUERQUE, A., SORENSON, A. L., LEAL-CARDOSO, J. H. (1995). Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. *J. Ethnopharmacol.*, 49: 41-49.
- ALMEIDA, R. N. & BARBOSA-FILHO, J. M. (1994). Avaliação do efeito antinocepcivo do óleo essencial e da rotundifolona obtidos de *Mentha x Villosa Hudson*. Programa e resumos da IX Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental 194 (Abstract) Caxambu, MG, Brazil.
- ASHLEY, C. C., MULLIGAN, I. P. & LEA, T. J. (1991).  $Ca^{2+}$  and activation mechanisms in skeletal muscle. *Rev. Biophys.*, 24: 1-73.
- AXELSON, J. & THESLEFF, S. (1958). Activation of the the contractile mechanism in striated muscle. *Acta Physiol. Scand.*, 44: 55-66.
- BERS, M. D. & FILL, M. (1998). Coordinated feet and the dance of ryanodine receptors. *Science*, 281: 790-791.

- BEZANILLA, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.*, v.80 n° 02: 555-592.
- BORBA, M. O. P., KOBAYASHI, S., ACA, E. B., MEDEIROS, F. P. (1990). Frações ativas de *Mentha crispa* sobre cultura de *Entamoeba histolytica* – cepa SAW 1627 (Parte II). IX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil 4.69 (Abstract). João Pessoa- PB, Brazil.
- BRENNER, B. (1986). The cross-bridge cycle in muscle. Mechanical, biochemical, and structural studies on single skinned rabbit psoas fibers to characterize cross-bridge kinetics in muscle for correlation with the actomyosin-ATPase in solution. *Basic Res. Cardiol.*, 81: 1-15.
- BRENNER, B. (1991). Muscle mechanics and biochemical kinetics in molecular mechanisms in muscular contraction, ed. SQUIRE, J. M., pp. 77-149. Boca Raton: CRC Press, Inc.
- BRILLANTES, A. M. B., ONDRIAS, K., SCOTT, A., KOBRINSKY, E., ONDRIASOVA, E., MOSCHELLA, M. C., JAYARAMAN, T., LANDERS, M., EHRLICH, B. E., MARKS, A. R. (1994). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding proteins. *Cell* 77, 513.
- BRODIN, P. & ROED, A. (1984a). Effects of eugenol on rat phrenic-nerve-diaphragm preparations. *Arch. Oral Biol.*, 8: 611-615.
- BRODIN, P. & ROED, A. (1984b). Inhibition by local anesthetic drugs at low and high

stimulation frequencies: a comparison between the isolated phrenic nerve of the rat and the phrenic nerve-diaphragm preparation. *Neuropharmacol.*, 23: 83-88.

BRUNDER, D. G., DETTBARN, C., PALADE, P. T. (1988). Heavy metal-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 263:18785-18792.

BRUNETON, J. (1995). *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants*. Intercept, Ltd., Hampshire, England, U. K.

CADWELL, J.J. & CASWELL, A.H. (1982). Identification of a constituent of the junctional feet linking terminal cisternae to transverse tubules in skeletal muscle. *J. Cell. Biol.*, 93: 543-550.

CALLAWAY, C., SERYSHEV, J. P., WANG, K. J., SALVIK, D. H., NEEDLEMAN, C., CANTU, Y., MARKS, A.R., HAMILTON, S. L. (1994). Localization of the high and low affinity  $[\text{H}_3]$  ryanodine binding sites on skeletal muscle  $\text{Ca}^{+2}$  release channel. *J. Biol. Chem.*, 269: 15876-15884.

CAPUTO, C. (1983). Pharmacological investigations of excitation-contraction coupling. In: *Handbook of Physiology. Skeletal Muscle*. Bethesda, MD. Am. Physiol. Soc., 1983, sect. 10, chapt., 8: 381-415.

CHALOVICH, J. M. (1992). Actin mediated regulation of muscle contraction. *Pharmacol. Ther.*, 55: 95-148.

- COOKE, R., (1997). Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiol. Rev.*, 77: 671-697.
- CORONADO, R., MORRISSETTE, J., SUKHAREVA, M., VAUGHAN, D. M. (1994). Structure and function of ryanodine receptors. *Am. J. Physiol.*, 266: C1485-C1504.
- COTMORE, J. M., BURKE, A., LEE, N. H., SHAPIRO, I. M. (1979). Respiratory inhibition of isolated rat liver mitochondria by eugenol. *Arch. Oral Biol.*, 24: 565-568.
- CRAVEIRO, A. A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C. H. S., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W. (1977). Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. *Ciência e Cultura* 29, Suppl., 455.
- CSERNOCH, L., KOVÁCS, L., SZUCS, G. (1987). Perchlorate and the relationship between charge movement and contractile activation in frog skeletal muscle fibers. *J. Physiol.* (London), 390: 213-227.
- CSERNOCH, L., SZENTESI, P., KOVÁCS, L. (1999). Differential effects of caffeine and perchlorate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* (London), 520.1: 217-230.
- DALLMEIER, K. & CARLINI, E. A. (1981). Anesthetic, hipothermic myorrelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. *Pharmacol.*, 22: 113-127.

- DONALDSON, S. K. (1989). Mechanisms of excitation-coupling in skinned muscle fibers. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 21: 411-417.
- DUKE, A. M. & STEELE, D. S. (1998). Effects of caffeine and adenine nucleotides on  $\text{Ca}^{2+}$  release by the sarcoplasmic reticulum in saponin-permeabilized frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, 513.1: 43-53.
- DULHUNTY, A. F., ZHU, P. PATTERSON, M. F., AHERN, G. (1992). Actions of perchlorate ions on rate soleus muscle fibers. *J. Physiol.*, 448: 99-119.
- EBASHI, S. (1991). Excitation-contraction coupling and mechanism of muscle contraction. *Ann. Rev. Physiol.*, 53:1-16.
- ENDO, M., TANAKA, M., OGAWA, Y. (1970). Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibers. *Nature*, 228: 34-36.
- ENDO, T. , OGISHIMA, K., TANAKA, H. & OHSHIMA, H. (1972). Studies on the anesthetic effect of eugenol in some fresh water fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38: 761-767.
- ENDO, M. (1977). Calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.*, 57:71-108.
- ENDO, M. (1985). Calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Curr. Top. Membr. Transp.*, 25: 181-230.
- FABIATO, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic

reticulum. Am. J. Physiol., 245 (Cell Physiol. 14): C1-C14.

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

FELDMEYER, D. & LÜTTGAU, H. C. (1988). The effect of perchlorate on  $\text{Ca}^{2+}$  currents and mechanical force in skeletal muscle fibers. Pflüg. Arch. 411, R190.

FILL, M. D. & BEST, P. M. (1989). Block of contracture in skinned frog skeletal muscle fibers by calcium antagonists. J. Gen. Physiol., 93: 429-449.

FINCH, E. A., TURNER, T. J., GOLDIN, S. M. (1991). Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate induced calcium release. Science, 252.

FITTS, R. H. & METZGER, J.M. (1988). Mechanisms of muscular fatigue. In Principles of Exercise Biochemistry (Poortsmans, J. R., ed), vol. 27: 212-229, Kager Press, Basel.

FLEISCHER, S. & INUI, M. (1989). Biochemistry and Biophysics of excitation-contraction coupling. Ann. Rev. Biophys. Chem., 18: 333-364.

FOGAÇA, R. T. H., CAVALCANTE, A. D. A., SERPA, A. K. L., SOUSA, P. J. C., COELHO-DE-SOUZA, A. N., LEAL-CARDOSO, J. H. (1997). The effects of essential oil of *Mentha x villosa* on skeletal muscle of the toad. Phytoter. Res., 11: 552-55.

FORD, L. E., PODOLSKY, R. J. (1970). Regenerative calcium release within muscle cells. *Science*, 167: 58-59.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. & JOGERSEN, A. O. (1994). Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, 56: 509-534.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1996). Functional significance of membrane architecture in skeletal and cardiac muscle. In *organellar ion channel and transporters*. Society General Physiologists, 490. Annual Symposium, edited by D. E. Clapham and B. E. New York: Rockefeller Univ. Press, p. 3-18.

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

FRISCH, J. & BHASKAR, S. N. (1968). Tissue response to eugenol containing peridental dressings. *J. Periondon.*, 38: 402-408.

FRUEN, B. R., MICKELSON, J. R., ROGHAIR, T. J., CHENG, H. L., LOUIS, C. F. (1994a). Anions that potentiate excitation-contraction coupling may mimic effect of phosphate on  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *Am. J. Physiol.*, jun., 266: c1729-35.

FRUEN, B. R., MICKELSON, J. R., SHOMER, N. H., ROGHAIR, T. J., LOUIS, C. F. (1994b). Regulation of sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor by inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.*, 269: 192-198.

- GARCÍA, J. & SCHNEIDER, M. F. (1995). Suppression of calcium release by calcium or procaine in voltage clamped rat skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, 485.2: 437-445.
- 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.
- 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. Pharmacol.*, 69: 1692-1697.
- GODT, R. E., FOGAÇA, R. T. H., ANDREWS, M. A. W. & NOSEK, T. M. (1993a). Influence of ionic strength on contractile force and energy consumption of skinned fibers from mammalian and crustacean striated muscle. In *Mechanism of myofilament sliding in muscle contraction*, eds. SUGY, H. & POLLACK, G. H., pp: 763-773. New York and London: Plenum Press.
- GODT, R. E., FOGAÇA, R. T. H., BROTTTO, M. A. P., KASSOUF-SILVA, I. & NOSEK, T. M. (1993b). Butanedione Monoxime (BDM) induces calcium release from the sarcoplasmic reticulum of crustacean striated muscle fibers. XXXII Congress of the International Union of Physiological Sciences- Glasgow 30.6/0, (Abstract).
- GODT, R. E., BROTTTO, M. A. P., FOGAÇA, R. T. H. & NOSEK, T. M. (1994). Uptake and release of calcium by sarcoplasmic reticulum (SR) in saponin-skinned striated muscle of lobster. *FASEB J.* (Abstract)

- GOLDMAN, Y. E. & BRENNER, B. (1987). Special topic: molecular mechanism of muscle contraction. *Ann. Rev. Physiol.*, 49: 629-636.
- GOMOLA, M. G., GOTTSCHALK, I., LUTTGAU, H. C. (1983). Perchlorate induced alterations in electrical and mechanical parameters of frog skeletal muscle fibers. *J. Physiol.*-(London), 343: 197-214.
- GONZÁLEZ, A. & RÍOS, E. (1993). Perchlorate enhances transmission in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *J. Gen. Physiol.*, 102: 373-421.
- GORDON, A M., HOMSHER, E. & REGNER, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev*, v. 80, n° 02: 853-924.
- GUTH, K. & POTTER, J. D. (1987). Effect of rigor and cycling cross-bridges on the structure of troponin C and on the  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of the  $\text{Ca}^{2+}$ -specific regulatory sites in skinned rabbit psoas fibers. *J. Biol. Chem.*, 262: 13627-13635.
- GYÖRKE, S. & PALADE, P. (1992). Effects of perchlorate on excitation-contraction coupling in frog and crayfish skeletal muscle. *J. Physiol.*, 456: 443-451.
- HAROOTUNIAN, A. T., KAO, J. P. Y., PARANJAPE, S., ADAMS, S. R., POTTER, B. V. L. & TSIEN, R. Y. (1991).  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in REF52 fibroblasts- $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated IP3 production or voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels as key positive feedback elements. *Cell. Calcium*, 12: 153-164.

HERRMANN-FRANK, A., RICHER, M., SARKOZI, S., MOHR, U., LEHMANN-HORN, F. (1996). 4-chlorocresol a potent and specific activator of skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem. Biophys. Acta*, 1289: 31-40.

HERRMANN-FRANK, A., LÜTTGAU, H., STEPHENSON, D. G. (1999). Caffeine and excitation-contraction coupling in skeletal muscle: a stimulating story. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 20: 223-237.

HIBBERD, M. G., & TRENTHAM, D. R. (1986). Relationship between chemical and mechanical events during muscular contraction. *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, 15: 119-161.

HIDALGO, C. & JAIMOVICH, E. (1989). Inositol triphosphate and excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 21: 267-282.

HILLE, B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes*. 2<sup>nd</sup> ed. Sinaur Associates. Inc. Sunderland. MA., USA.

HUANG, C. L. H. (1986). The differential effects of twitch potentiators on charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.-(London)*, 380: 17-33.

HUXLEY, A. F. & NIEDERGERKE, R. (1954). Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle fibers. *Nature*, 173: 971-973.

HUXLEY, H. E. & HANSON, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during

contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, 173: 973-976.

HUXLEY, H. E. (1957). The double array of filaments in cross-striated muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3: 631-647.

INUI, M. & FLEICHSHER, S. (1988). Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 262: 1740-1747.

JUNAKAR, P. R. & DULHUNTY, A. F. (1994). Monoclonal antibody to skeletal muscle ryanodine receptor detects a polypeptide in rat brain: comparison of immunogenic fragments after limited proteolysis. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 32: 29-37.

KALABOKIS, V. N., O'NEALL-HENNESSEY, E., SZENT-GYÖRGYI, A.G. (1994). Regulatory domains of myosins: influence of heavy chain on  $Ca^{+2}$ -binding. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 15: 547-553.

KLEIN, M. G., SIMON, B. J., SCHNEIDER, M. F. (1990). Effects of caffeine on calcium release from the sarcoplasmic reticulum in frog skeletal muscle fibers. *J. Physiol.*, 425:599-626.

KLEIN, M. G., SIMON, B. J., SCHNEIDER, M. F. (1992). Effects of procaine and caffeine on calcium release from the sarcoplasmic reticulum in frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, 453: 341-366.

- KUWAJIMA, G., FUTATSUGI, A., NINOBE, M., NAKANISHI, S., MIKOSHIBA, K. (1992). Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. *Neuron*, 9: 1133-1142.
- LAI, F. A., ERICSON, H., BLOCK, B. A., MEISSNER, G. (1987). Evidence for a junctional feet-ryanodine receptor complex from sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 143: 704-709.
- LAI, F. A., ERICSON, H. P., ROUSSEAU, E., LIU, Q.Y., MEISSNER, G. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*, 331: 315-319.
- LAI, F. A., DENT, M., WICKENDEN, C., XU, L., KUMARI, G., MISRA, M., LEE, H. B., SAR, M., MEISSNER, G. (1992). Expression of a cardiac  $Ca^{+2}$ -release channel isoform in mammalian brain. *Biochem. J.*, 288: 553-564.
- LAUNIKOS, B. S. & STEPHENSON, D. G. (1997). Effect of saponin treatment on the sarcoplasmic reticulum of rat, cane toad and crustacean (yabby) skeletal muscle. *J. Physiol.*, 504.2: 425-437.
- LEAL-CARDOSO, J. H. & ALBUQUERQUE, A. A. C. (1987). Ações do CzEO, anetol e estragol no músculo sartório de sapo submetido ao "rapid cooling contraction" (RCC). Programa de Resumos da II Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, p. 306.

- LEAL-CARDOSO, J. H., COELHO DE SOUSA, A. N., FIGUEIREDO, I. M. B., MILFONT, J. M. B., SOUZA, I. T. (1988). Benzyl-eugenol antagonizes the contracture induced by eugenol on skeletal muscle. *Rev. Med. Univ. Fed. Ceará*, 1-2: 35-39, Fortaleza.
- LEAL-CARDOSO, J. H., COELHO DE SOUSA, A. N., SOUSA, E. T., FIGUEIREDO, I. M. B. (1994). Effects of eugenol on excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Arch. Inter. Pharmacol. Therap.*, 327: 113-124.
- LEAL-CARDOSO, J. H. & FONTANELES, M. C. (1999). Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. *Ann. Acad. Bras. Ci.*, 71 (2).
- LEAVIS, P. C. & GERGELY, J. (1984). Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 16: 235-305.
- LEDBETTER, M. W., PREINER, J. K., LOUIS, C. F., MICKELSON, J. R. (1994). Tissue distribution of ryanodine receptors isoforms and alleles determined by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.*, 269: 31544-31551.
- LIMA, C. A. H., ALMEIDA, R. N., BARBOOSA-FILHO, J. M., THOMAS, G. (1994). Efeitos farmacológicos do óleo essencial da *Mentha x villosa Hudson* sobre o sistema nervoso central. Programa e Resumos da IX Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental 202 (Abstract). Caxambu, MG, Brazil.
- LOPEZ, J. R., ALLEN, P., ALAMO, L. RYAN, J. F., JONES, D. E., SRETER, F. (1987).

Dantrolene prevents the malignant hyperthermic syndrome by reducing free intracellular calcium concentration in skeletal muscle susceptible swine. *Cell Calcium*, 8: 385-396.

LÜTTGAU, H. C. & OETLIKER, H. (1968). The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibers. *J. Physiol.*, 194: 51-74.

LÜTTGAU, H. C., GOTTSCHALK, G., KOVÁCS, L., FUXREITER, M. (1983). How perchlorate improves excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers. *Biophys. J.*, 43: 257-249.

MA, J. & CORONADO, R. (1988). Heterogeneity of conductance states in calcium channels of skeletal muscle. *Biophys. J.*, 53: 387-395.

MA, J. (1989). Reconstitution of channels involved in excitation-contraction coupling of skeletal muscle (PhD thesis). Waco, Texas: Baylor College of Medicine.

MA, J., ANDERSON, K., SHIROKOV, R., LEVIS, R., GONZÁLEZ, A., KARHANEK, M., HOSEY, M. M., MEISSNER, G., RIOS, E. (1993). Effects of perchlorate on the molecules of excitation-contraction coupling of skeletal and cardiac muscle. *J. Gen. Physiol.*, 102: 423-448.

MAIA, S. B., RAO, V. S. N., MATOS, F. J. A. (1992). Constituintes do óleo essencial das folhas da *Mentha x villosa Hudson*. Thesis dissertation to the MS degree, Fed. Univ. Paraíba, João Pessoa.

- MARKS, A. R., TEMPST, P., HWANG, K. S., TAUBMAN, M. B., INUI, M., CHADWICK, C., FLEISCHER, S., NADAL-GINARD, B. (1989). Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptors/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8683-8687.
- MARTIN, C., ASHELEY, R., SHOSHAN-BARMATZ, V. (1993). The effect of local anesthetics on the ryanodine receptor/calcium release channel of brain microsomal membranes. *FEBS Lett.*, 328: 77-81.
- MARXS, S. O., ONDRIAS, K., MARKS, A. R. (1998). Coupled gating between individual skeletal muscle  $Ca^{2+}$  release channels (ryanodine receptors). *Science*, 281: 818-821.
- MATHIAS, R. T., LEVIS, R. A., EISEMBERG, R. S. (1980). Electrical models of excitation-contraction coupling and charge movement in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 89: 145-176.
- MEISSNER, G. & FLEISHER, S. (1971). Characterization of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 24: 356-378.
- MEISSNER, G. (1983). Monovalent ion and calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biochem.*, 55: 65-82.
- MEISSNER, G. & HENDERSON, J. S. (1987). Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on  $Ca^{2+}$  and is modulated by  $Mg^{2+}$  adenine nucleotide and calmodulin. *J. Biol. Chem.*, 262: 3065-3073.

- MEISSNER, G., LAI, F. A., ANDERSON, K., XU, L., LIU, Q.-Y., HERRMANN-FRANK, A., ROUSSEAU, E., JONES, R. V. & LEE, H. -B. (1991). Purification and reconstitution of the ryanodine- and caffeine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release channel complex from muscle sarcoplasmic reticulum. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 304: 241-256.
- MEISSNER, G. (1994). Ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channels and their regulation by endogenous effectors. *Ann. Rev.*, 56: 485-508.
- MENEZES, A. M. S., ALMEIDA, F. R. C., RAO, V. S. N. (1990). Anti-inflammatory activity in the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*. *Fitoterapia*, 61: 252-254.
- MISSIAEN, L., DE SMEDT, H., DROOGMANS, G., CASTEELS, R. (1992).  $\text{Ca}^{2+}$  release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal  $\text{Ca}^{2+}$  in permeabilized cells. *Nature*, 357: 599-602.
- MORI, H. & TONOMURA, Y. (1983). The gating behavior of a channel for calcium induced calcium release in fragment sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem.*, 93: 1271-1285.
- MOSS, R. L. & HOFMANN, P. (1992). Cellular and molecular basis of muscle contraction. *Fundamental of Medical Cell Biology*, v. 5b, Cell Homeost. Motil., 185-237.
- MURAYAMA, T., KUREBAYASHI, N., OGAWA Y. (1998). Effects of caffeine and  $\text{Mg}^{2+}$  on the  $\text{Ca}^{2+}$  activation and inactivation sites of frog ryanodine receptor. *Biophys. J.*, 74: A163.

- NAYLOR, G. R. S., BARTELS, E. M., BRIDGMAN, T. D. & ELLIOTT, G. F. (1985). Donnan potentials in rabbit psoas muscle in rigor. *Biophys. J.*, 48: 47-59.
- NOSEK, T. M., LEAL-CARDOSO, J. H., MCLAUGHLIN, M. & GODT, R. E. (1990). Inhibitory influence of phosphate and arsenate on contraction of skinned skeletal and cardiac muscle. *Am. J. Physiol.*, 259: C933-C939.
- NOSEK, T. M., FOGAÇA, T. H., HATCHER, C. J., BROTTTO, M. A. P., GODT, R. E. (1997). Effect of cardiac neural crest ablation on contractile force and calcium uptake and release in chick heart. *Am. J. Physiol.*, 223: H1464-H1471.
- OBA, T., KOSHITA, M., AOKI, T., YAMAGUCHI, M. (1997). Bay K 8644 and  $\text{ClO}_4^-$  potentiate caffeine contracture without  $\text{Ca}^{2+}$  release channel activation. *Am. J. Physiol.*, 41: C41 – C47.
- OZEKI, M. (1975). The effects of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50C: 183-191.
- PALADE, P. (1987). Drug-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from isolated sarcoplasmic reticulum: Release involving a  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ - release channel. *J. Biol. Chem.*, 262: 6135-6141.
- PERES, A., RACCA, C., BERTOLLINI, L., STURANI, E. (1991). Cytosolic calcium responses induced by photolytic release of 1,4, 5-inositol trisphosphate in single human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1092: 89-93.

- RAO, V. S. N., MENEZES, A. M. S., VIANA, G. S. B. (1990). Effects of myrcene on nociception in mice. *J. Pharmacol.*, 42: 877-878.
- RIOS, E., KARHANEK, M., MA, J. (1992). An allosteric model of transmission in E-C coupling (abstract). *Biophys. J.*, 61: A131.
- RIOS, E., KARHANEK, M., MA, J., GONZÁLEZ, A. (1993). An allosteric model of the molecular interactions of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 102: 449-481.
- RIOS, E., MA, J. & GONZALEZ, A. (1991). The mechanical hypothesis of excitation-contraction (EC) coupling in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 12: 127-135.
- RIOS, E. & PIZARRO, G. (1991). Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, 71, n° 03: 849-908.
- ROJAS, E., NASSAR-GENTINA, V., POLLARD, M. E., LUXORO, M. (1992). Mechanisms of calcium release from terminal cisternae in crustacean muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 311: 305-317.
- ROUSSEAU, E., LADINE, J., LIU, Q., MEISSNER, G. (1988). Activation of the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 267: 75-86.

- RÜEGG, J. C. (1988). Calcium in muscle activation. Springer-Verlag, New York.
- SANDOW, A. (1965). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Pharmacol. Rev.*, 17: 265-320.
- SANTANA, C. F., ALMEIDA, E. R., DOS SANTOS, E. R., SOUZA, I. A. (1992). Actions of *Mentha crispera* hydroethanolic extract in patients bearing intestinal protozoan. *Fitoterapia*, 63: 409-410.
- SARKOZI, S., SZENTESI, P., CSERI, J., KOVACS, L., CSERNOCH, L. (1996). Concentration-dependent effects of tetracaine on excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*
- SCHNEIDER, M. F. & CHANDLER, W. K. (1973). Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature*, 242: 244-246.
- SCHNEIDER, M. F. (1994). Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Ann. Rev. Physiol.*, 56: 463-484.
- SHENG, Z., FRANCOIS, J. M., HITCHCOCKDEGREGORI, S. E. & POTTER, J. D. (1991). Effects of mutations in the central helix of troponin-C on its biological activity. *J. Biol. Chem.*, 266: 5711-5715.
- SHOSHAN-BARMATZ, V., MACLEMANNAN, D. H., WOOD, D. S. (1981). A proton

- gradient controls a calcium-release channel in sarcoplasmic reticulum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 4828-4832.
- SHOSHAN-BARMATZ, V. & ZCHUT, S. (1993). The interaction of local anesthetics with the ryanodine receptor of sarcoplasmic reticulum. J. Membr. Biol., 133: 171-181.
- SHOSHAN-BARMATZ, V. & ASHELEY, R. H. (1998). The structure, function, and cellular regulation of ryanodine-sensitive  $\text{Ca}^{+2}$  release channels. Intern. Rev. Citol., 183: 185-270.
- SILVA, J. C. R., RAO, V. S. N. (1992). Involvement of serotonin and eicosanoids in rat paw edema response to the essential oil of *Pilocarpus spicatus*. Mediat. Inflamm., 1: 167-169.
- SIMON, B. J., KLEIN, M. G., SCHNEIDER M. F. (1989). Caffeine slows turn-off of calcium release in voltage clamped skeletal muscle fibers. Biophys. J., 55: 793-797.
- SIPIDO, K. R. & WIER, W. G. (1991). Flux  $\text{Ca}^{2+}$  across the sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells during excitation-contraction coupling. J. Physiol.-London., 435: 605-630.
- SMITH, J. S., CORONADO, R., MEISSNER, G. (1986). Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by  $\text{Ca}^{2+}$  and ATP and modulation by  $\text{Mg}^{2+}$ . J. Gen. Physiol., 88: 573-588.
- SOMLYO, A. P., WALKER, J. W., GOLDMAN, Y. E., TRENTHAM, D. R., KOBAYASHI, S., F. R. S., KITAZAWA, T., SOMLYO, A. V. (1988). Inositol trisphosphate, calcium and

muscle contraction. *Phil. Trans. Soc. London B*, 320: 399-414.

SQUIRE, J. (1981). *The structural basis of muscular contraction*. Plenum Press, New York.

SORENSEN, M. COELHO, H. S. L., REUBEN, J. P. (1986). Caffeine inhibition of calcium accumulation by sarcoplasmic reticulum in mammalian skinned fibers. *J. Membr. Biol.*, 90: 219-230.

STEPHENSON, E. W. (1981). Activation of fast skeletal muscle: Contributions of studies on skinned fibers. *Am J. Physiol.*, 240: C1-C19.

STRANG, P. F. & POTTER, J. D. (1992). A monoclonal antibody that recognizes different conformational states of skeletal muscle troponin C and other calcium binding proteins. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 13: 308-314.

SZÜCS, G. CSERNOCH, L. MAGYAR, J., KOVÁCS, L. (1991). Contraction threshold and the "hump" component of charge movement in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 97: 897-911.

TANABE, T., TAKESHIMA, H., MIKAMI, A., FLOCKERZI, V. TAKAHASHI, H., KANGAWA, K., KOJIMA, M., MATSUO, H., HIROSE, T., NUMA, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature-London*, 328: 313-318.

- 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*, v. 346: 567-569.
- TEGGAZIN, V., SCUTARI, E., TREVES, S., ZORZATO, F. (1996). Chlorocresol, an additive to commercial succinylcholine, induces contracture of human malignant hyperthermia susceptible muscle. *J. Anesthesiol.*, 84: 1380-1385.
- THORENS, S. & ENDO, M. (1975). Calcium induce calcium release and depolarization-induced calcium release: their physiological significance. *Proc. Japan Acad.*, 51: 473-478.
- VALDIVIA, C., VAUGHAN, D., POTTER, B. V. L., CORONADO, R. (1992). Fast release of  $45 \text{ Ca}^{2+}$  induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and  $\text{Ca}^{2+}$  in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle: Evidence for two types of  $\text{Ca}^{2+}$  release channels. *Biophys. J.*, 61: 1184-1193.
- VAN WINKLE, W. B. (1976). Calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: Site of action of dantrolene sodium. *Science*, 193: 1130-1131.
- VERGARA, J., TSIEN, R. Y. & DELAY, M. (1985). Inositol 1,4,5,-triphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction counpling in muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 82: 6352-6356.
- WANG, K. (1996). Titin/connectin and nebulin: giant protein rolers of muscle structure and

function. *Adv. Biophys.*, 33: 123-134.

WEBER, A. & HERZ, R. (1968). The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. *J. Gen. Physiol.*, 52: 750-759.

WIER, W. G. & YUE, D. T. (1986). Intracellular calcium transients underlying the short-term force-interval relationship in ferret ventricular myocardium. *J. Physiol.-(London)*, 376: 507-530.

WIER, W. G. & BLATTER, L. A. (1991).  $Ca^{2+}$ -oscillations and  $Ca^{2+}$ -waves in mammalian cardiac and vascular smooth muscle cells. *Cell. Calcium.*, 12: 241-254.

WOLOSKER, H., PACHECO, A. G. F., MEIS, L. (1992). Local anesthetics induced fast  $Ca^{2+}$  efflux through a nonenergized state of the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n° 09: 5785-5789.

YANO, M., EL-HAYEK, R. & IKEMOTO, N. (1995). Effects of perchlorate on depolarization-induced conformational changes in the junctional foot protein and  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 34: 12584-12589.

XU, L., JONES, R., MEISSNER, G. (1993). Effects of local anesthetics on single channel behavior of skeletal muscle calcium release channel. *J. Gen. Physiol.*, 101: 207-233.

ZHANG, L., BRADLEY, M. E., KHOYI, M., WESTFALL, D. P. & BUXTON, I. L. O. (1993).

Inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding sites in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 905-912.

ZHU, Y. & NOSEK, T. M. (1992). Ruthenium red affects the contractile apparatus but not sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release of skinned papillary muscle. *Pflüg. Arch.*, 420: 255-258.