

THAÍS PACHECO

**EFEITOS DO ANETOL NOS MECANISMOS DE
CAPTAÇÃO E LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO DO
RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO DE CÉLULA
MUSCULAR ESQUELÉTICA DE RÃ**

Dissertação apresentada à Coordenação
do Curso de Pós-Graduação em Biologia
Celular, da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rosalvo Tadeu
Hochmuller Fogaça

CURITIBA

2001

THAÍS PACHECO

**EFEITOS DO ANETOL NOS MECANISMOS DE
CAPTAÇÃO E LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO DO
RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO DE CÉLULA
MUSCULAR ESQUELÉTICA DE RÃ**

Dissertação apresentada à Coordenação
do Curso de Pós-Graduação em Biologia
Celular, da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre.

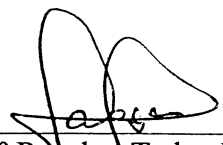
Orientador: Prof. Dr. Rosalvo Tadeu
Hochmuller Fogaça

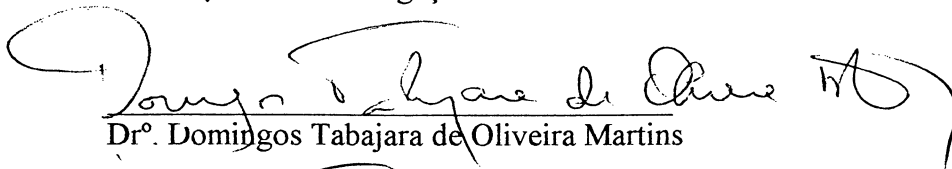
CURITIBA

2001

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “**EFEITOS DO ANETOL NOS MECANISMOS DE CAPTAÇÃO E LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO DE CÉLULA MUSCULAR ESQUELÉTICA DE RÃ**”, de autoria da Pós-Graduanda Thaís Pacheco, e composta pelos Professores: Drº Rosalvo Tadeu Fogaça (como Orientador e Presidente); Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins(UFMT); Drª Carolina Arruda Freire (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Drº Rosalvo Tadeu Fogaça, nota 9 (NOVE); Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins ,nota 10 (DEZ); e Drª. Carolina Arruda Freire , nota 9,0 (NOVE). De acordo com o Regimento interno do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, a candidata foi: APROVADA com a nota 9,3 (NOVE, TRÊS), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 22 de Junho de 2001.


Drº Rosalvo Tadeu Fogaça


Drº. Domingos Tabajara de Oliveira Martins


Drª. Carolina Arruda Freire

A meus pais
Géo e Darli

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Rosalvo T.H. Fogaça pelos valiosos ensinamentos, pela amizade e compreensão nos momentos difíceis e por sempre mostrar que eu seria capaz.

À Ilana Kassouf Silva, pelas valorosas contribuições para a execução deste trabalho.

A todos os professores do curso de pós-graduação em morfologia, que com seus conhecimentos permitiram meu desenvolvimento científico.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pelo companheirismo e amizade, em especial ao amigo Marcelo Schatzmann.

A todos os estagiários do laboratório de fisiologia da contração muscular, pelo auxílio durante os experimentos.

Aos amigos Marco S. L. Alves e Edson L. de Oliveira pela valorosa contribuição nos muitos momentos de dúvidas.

À especial amiga Anna Raquel Silveira Gomes, que foi companheira, irmã, confidente e muitas vezes exemplo e certeza que tudo daria certo.

Ao querido amigo Rafael Kaniak, que será sempre um exemplo de solidariedade e gentileza.

A todos os meus amigos que tiveram muita paciência e sempre uma palavra de incentivo.

Aos meus familiares, que me deram força e "colo" nos momentos difíceis.

Ao Antonio Tavares Netto, talvez meu maior incentivador.

A meus pais, porque tudo começou com eles e por eles.

Gostaria de fazer um agradecimento em especial à amiga Marion Minini, por permitir, mesmo que por pouco tempo, que eu pudesse compartilhar a sua amizade e felicidade.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Morfologia da Fibra Muscular Estriada Esquelética	02
1.2 Filamento Grosso do Sarcômero	04
1.3 Filamento Fino do Sarcômero	06
1.3.1 Actina	07
1.3.2 Tropomiosina	08
1.3.3. Troponina	09
1.4 Mecanismo Molecular da Contração Muscular	11
1.5 Receptores Envolvidos no Processo de Acoplamento	
Excitação-Contração	14
1.5.1 Receptores Dihidropiridínicos (Dhpr)	14
1.5.2 Receptores Raionidínicos (RiRs)	16
1.5.3 Demais Proteínas Associadas à Regulação da Liberação de Cálcio do Retículo Sarcoplasmático	19
1.6 Algumas Drogas Utilizadas para o Estudo do Mecanismo de Acoplamento Excitação-Contração	20
1.7 Objetivos	24
2 MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Obtenção e Sacrifício dos Animais	26
2.2 Músculo Intacto de Anfíbio	26

2.2.2 Experimentos Realizados com Anetol em Músculo Sartório Intacto de Anfíbio	27
2.2.2 Experimentos Realizados com Perclorato em Músculo Sartório Intacto de Anfíbio	28
2.2.3 Experimentos Realizados com Perclorato e Anetol em Músculo Sartório Intacto de Anfíbio	28
2.3 Preparação da Fibra Muscular Desmembranada com Uso de Saponina	29
2.3.1 Protocolo Experimental	30
2.4 Preparação de Fibras Desmembranada com Uso de Triton X-100	32
2.5 Soluções	33
2.6 Reagentes Químicos	35
3 RESULTADOS	36
3.1 Avaliação dos Efeitos do Anetil (0,03; 1; 3,3 mM) em Contratura Induzida por 100 mM de K ⁺ em Músculo Sartório Isolado de Rã	36
3.2 Efeitos do Anetol (1 mM) em Contratura Induzida por Cafeína (1 mM) em Músculo Sartório Isolado de Rã	36
3.3 Efeito do Anetol (1 mM) em Contratura Induzida por Cafeína (3 mM) em Músculo Sartório Isolado de Rã	40
3.4 Efeito do Anetol (1; 3 ou 6 mM) nas Contraturas Induzidas por Potássio (4; 40; 80 ou 100 mM) em Músculo Sartório Isolado de Rã	41
3.5 Efeito do Perclorato (2 mM) nas Contraturas Induzidas por K ⁺ (40, 80 ou 100 mM) em Músculo Sartório Isolado de Rã	51
3.6 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

3.7 Efeito do Anetol (1 mM) na Contratura Induzida por Concentrações Crescentes de Perclorado (1; 3; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60 mM) em Preparações de Músculo Sartório Isolado de Rã Mantidos em Ringer Normal	54
3.8 Efeito do Anetol (1 mM) na Contratura Induzida por Concentrações Crescentes de Perclorato em Preparações de Músculo Sartório Isolado de Rã Mantidos em Ringer 100 Mm de K⁺	55
3.3 Efeito da Interação da Cafeína (1 mM) e do Íon Perclorato (10 mM) com o Anetol (1 mM) em Contraturas de Fibras de Rã Permeabilizadas com Saponina	57
3.10 Efeito do Anetol (5 mM) na Relação Força/[Ca²⁺] em Fibra Permeabilizada com Triton X – 100	58
3.11 Efeito da Procaína (10 mM) sobre Contraturas Induzidas pelo Anetol (1 mM) e Perclorato (10 mM) em Fibra Permeabilizada com Saponina	58
4 DISCUSSÃO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 – Mecanismo de contração muscular	02
Fig. 2 – Estrutura da molécula de miosina.....	06
Fig. 3 – Filamentos finos do sarcômero	06
Fig. 4 – Filamento fino em que está demonstrada a molécula de actina	08
Fig. 5 – Molécula de Troponina indicando as regiões NH ₂ terminal e COOH terminal, conectadas por uma longa hélice central.....	10
Fig. 6 – Modelo de ciclo de pontes transversais	13
Fig. 7 – Receptor DHPR	16
Fig. 8 – Efeito do anetol em contratura induzida por 100 mM de K ⁺	37
Fig. 9 – Efeito do anetol (1 mM) em contratura induzida por cafeína (mM)	39
Fig. 10 – Efeito do anetol (1 mM) em contratura induzida por cafeína (3 mM) .	42
Fig. 11 – Efeito do anetol (1 mM).....	44
Fig. 12 – Efeito do anetol (3 mM).....	46
Fig. 13 – Efeito do anetol (6 mM).....	48
Fig. 14 – Efeito do perclorato (2mM).....	50
Fig. 15 – Curva dose-resposta ao perclorato (0,1 à 150 mM).....	53
Fig. 16 – Efeito do anetol (1 mM) em Ringer normal	56
Fig. 17 – Efeito do anetol (1 mM) na contratura induzida por contrações crescentes de perclorato.....	59
Fig. 18 – Efeito da interação da cafeína (1 mM) e do íon perclorato (10 mM) .	61
Fig. 19 – Efeito do anetol (5 mM) na relação força / [Ca ²⁺]	63
Fig. 20 – Efeito da Procaína (10 mM) sobre contraturas induzidas pelo anetol (1 mM)	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BES	Ácido N,N-Bis (2hidroxietil-2-aminoetanosulfônico)
CICR	Calcium – induce calcium release (cálcio induz a liberação de cálcio)
CP	Creatina fosfoquinase
DHPR	Receptor dihidropirínidico
EGTA	Ácido etinelo bis (b-amino etil éter N,N,N'N' tetracético)
IP3	Receptor 1, 4, 5 trifosfato de inositol
kDa	Quilodalton
KOH	Hidróxido de potássio
MGC1 ²	Cloreto de magnésio
Mg ²⁺	Íon magnésio
mM	Milimolar
NC1	Cloreto de sódio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
pCa	-log [Ca ²⁺]
Pi	Fosfato inorgânico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RS	Retículo sarcoplasmático
RiR	Receptor rianodínico

RESUMO

Utilizando-se de músculo sartório intacto de rã e de fibras musculares quimicamente desmembranadas com o uso de saponina e Triton X - 100, foi realizado um estudo dos efeitos do anetol, perclorato isoladamente e em combinação no mecanismo de liberação de cálcio do RS e no sistema contrátil. Foi observado em músculo intacto que: 1. o anetol em concentrações entre 1-3mM foi capaz de bloquear a contratura induzida por 100mM de K^+ . O anetol (1mM) potencializou o efeito contraturante da cafeína (3mM); 2. as contraturas induzidas por 40, 80 e 100mM de K^+ foram inibidas pelo efeito do anetol (1, 3 ou 6mM) respectivamente; 3. o efeito contraturante do perclorato (0,1 à 150mM) só se manifestou quando o músculo foi mantido numa concentração extracelular de potássio de 4mM. Em fibras permeabilizadas com saponina observou-se que o anetol (1mM) e o perclorato (10mM) não induziram liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático por si só. Com a associação dos dois compostos, a contratura da fibra foi potencializada. A procaína bloqueou esta contratura. Em fibras permeabilizadas com Triton X - 100 observou-se que o anetol não alterou a sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio ou a força máxima das fibras.

ABSTRACT

This work has the attempt to show the study of the effects of the anethole and the perchlorate separately and in combination in the mechanism of calcium liberation of the RS and in the contractile system making use of the intact frog sartorium muscle and of the muscular fibers that were dismembered through chemical reaction. It was observed in an intact muscle that: 1) the anethole in concentrations between 1 – 3 mM was able to block the induced contraction by 100mM of K^+ . The anethole (1 mM) increased the contract effect of the caffeine (3 mM). 2) The contracts induced by 40.80 and 100 M of K^+ where inhibited by the anethole effect (1,3 or 6 mM) respectively. 3) The contracted effect of the perchlorate (0,1 to 150 mM) was observed when the muscle was maintained in extra-cellular concentration of 4 mM potassium. It was observed in permeable fibers with saponin that the anethole (1 mM) and the perchlorate (10 mM) did not induce the calcium liberation of the sarcoplasmatic reticulum by itself. The contraction of the fiber increased with the use of those two components. The procaine blocked this contraction. It was also observed that the anethole did not alter the sensitivity of the contract system in relation to calcium or the maximum strength of fibers in permeable fibers with Triton X-100.

1 INTRODUÇÃO

O mecanismo que permite aos seres vivos realizar movimentos, sempre despertou curiosidade nos pesquisadores através dos tempos. Nos animais superiores, esse mecanismo ocorre nas células musculares altamente especializadas, as quais têm como função principal, a produção de força e / ou a produção de trabalho externo.

Fisiologicamente a ativação da contração muscular estriada depende da liberação de neurotransmissor (acetilcolina) na placa mioneural (Fig. 1). Este neurotransmissor liberado ocupa receptores específicos na membrana citoplasmática da fibra muscular e desencadeia modificações nas propriedades elétricas, que podem resultar na geração de um potencial de ação. Este, por sua vez, propaga-se pelo sistema tubular transverso e desencadeia, por meio ainda não completamente conhecido, a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. Por definição, o processo de acoplamento excitação-contração engloba complexos eventos elétricos e bioquímicos envolvidos na despolarização do sarcolema e a subsequente liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático (MOSS e HOFMANN, 1992). Após a sua liberação o íon cálcio intracelular liga-se a sítios específicos de baixa afinidade presentes na molécula de troponina C, (ZOT e POTTER, 1987; HAK *et al.* 1993; WANG *et al.* 1993) provocando modificações estéricas do complexo troponina-tropomiosina (ZOT e POTTER, 1987) permitindo assim, que ocorram interações cíclicas da cadeia pesada da miosina (pontes transversas) com os filamentos finos de actina, o que resulta na produção de força e / ou no encurtamento dos sarcômeros (WANG *et al.* 1992; HUXLEY, 1957; BRENNER, 1986; GOLDMAN e BRENNER, 1987; BRENNER e YU, 1993).

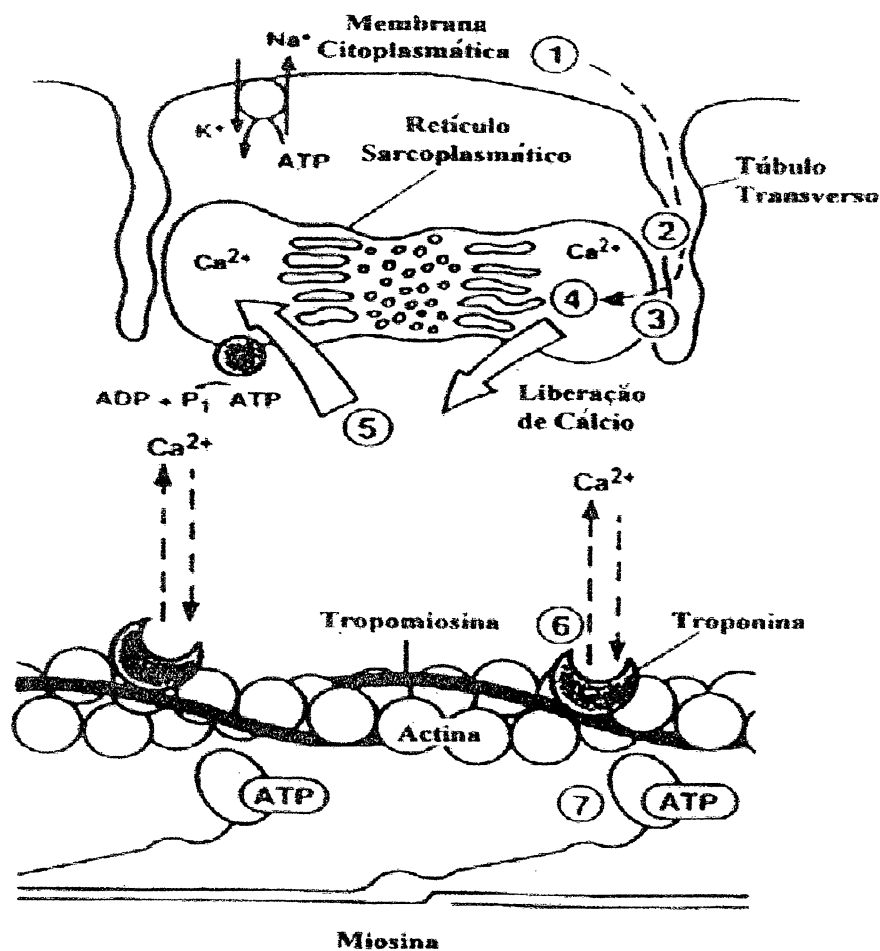


Figura 1 – Mecanismo de contração muscular

1.1 Morfologia da Fibra Muscular Estriada Esquelética

O músculo estriado esquelético é formado por células individuais, denominadas fibras musculares estriadas esqueléticas, que são células formadas durante a embriogênese, pela fusão de muitas células precursoras, denominadas mioblastos. Estas células apresentam aspecto cilíndrico e multinucleado, cujos núcleos localizam-se na região periférica da célula, abaixo do sarcolema (GILBERT *et al.* 1999).

Cada fibra muscular apresenta centenas de miofibrilas que são estruturas cilíndricas com diâmetro de 1 a 2 μm e localizam-se longitudinalmente à fibra

preenchendo o seu interior. O sarcoplasma, as mitocôndrias e outros elementos celulares estão localizados entre as miofibrilas. Cada miofibrila é constituída por filamentos grossos e filamentos finos. Os filamentos finos apresentam cerca de 7nm de espessura e 1,0 μm de comprimento e os filamentos grossos apresentam cerca de 10 a 14 μm de largura e 1,6 μm de comprimento (em mamíferos). A disposição dos filamentos grossos e finos é responsável pelo aspecto estriado do músculo, que resulta da repetição regular de faixas transversais densas separadas por faixas menos densas.

Análises de microscopia eletrônica demonstram que essas estriações transversais existem devido ao arranjo de proteínas que formam o aparelho contrátil (actina e miosina).

A unidade contrátil fundamental da fibra muscular é denominada sarcômero. Um sarcômero consiste na região entre duas linhas Z consecutivas; e no interior pode-se encontrar duas semibandas I separadas por uma banda A. Cada banda A apresenta uma zona mais clara no seu centro, a banda H, que contém um disco central M, também denominado linha M.

Estruturalmente a linha Z apresenta como componente primário a proteína α -actina e as linhas Z de miofibrilas adjacentes, conectadas por meio de proteínas específicas, como por exemplo, a desmina (HIJIKATA *et al.* 1999).

As bandas I são adjacentes às linhas Z e apresentam filamentos formados por actina, tropomiosina e troponina. Cada filamento está ligado à linha Z por suas extremidades (ALBERTS *et al.* 1997). Os filamentos finos alongam-se através da banda I e penetram na banda A (MOSS e HOFMANN, 1992).

A banda A, que fica localizada entre duas bandas I, apresenta filamentos grossos que são constituídos de miosina em organização hexagonal e de filamentos finos, formados por actina, tropomiosina e troponina entre os filamentos grossos.

Estes filamentos grossos de miosina estão ligados a uma proteína denominada titina ou conectina. Essa proteína apresenta forma semelhante a uma corda e se estende dos filamentos grossos até o disco Z, funcionando como molas, mantendo os filamentos grossos centralizados no sarcômero (ALBERTS *et al.* 1997).

No sarcômero pode-se observar uma proteína denominada nebulina que é formada por um motivo repetitivo de 35 aminoácidos. A função dessa proteína é regular a organização da actina e o comprimento dos filamentos durante o desenvolvimento do músculo (ALBERTS *et al.* 1997).

Na região central do sarcômero encontra-se a zona H, que é formada pela região da banda A que não apresenta nenhum filamento fino (MOSS e HOFMANN, 1992).

Na linha M, presente no sarcômero, são encontradas proteínas específicas como a proteína M e MM-creatina quinase. Essas proteínas estão ligadas aos filamentos contendo miosina na região central do sarcômero.

1.2 Filamento Grosso do Sarcômero

É um polímero bipolar da molécula de miosina. A miosina é um dos principais componentes de inúmeros sistemas contráteis e, nas fibras musculares estriadas, representa 50% do total de proteínas presentes neste tipo celular (MOSS e HOFMANN, 1992).

A miosina encontrada na fibra muscular pertence à subfamília denominada miosina II. Existe outro grupo de miosinas menores que estão presentes em células não musculares, e a melhor caracterizada pertence ao grupo das miosinas I.

A molécula de miosina é assimétrica e possui massa molecular de aproximadamente 540Kda. Esta molécula apresenta-se constituída de seis polipeptídios. Pode-se diferenciar na molécula de miosina duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Estas duas cadeias leves são denominadas LC₁ e LC₂ (MOSS e HOFMANN, 1992).

As cadeias pesadas da miosina são formadas por uma região globular, em que estão presentes as terminações amino das cadeias polipeptídicas, sendo esta região, denominada de cabeça da miosina ou subfragmento 1 (S1). A cabeça da miosina apresenta atividade atpásica e projeta-se a partir do filamento grosso, interagindo com a actina, para determinar a geração de força e / ou deslizamento dos filamentos finos.

O restante da cauda forma duas longas cadeias polipeptídicas enroladas em α -hélice, apresentando as terminações carboxílicas das moléculas, conhecidas como caudas da miosina. Estas caudas são unidas com aproximadamente 150mm de comprimento e 2mm de espessura (COOKE, 1997).

As cabeças presentes nas cadeias pesadas unem-se a dois pares de cadeias leves. A cauda é responsável pela agregação da miosina para formar a parte estrutural dos filamentos grossos. A cabeça da miosina apresenta sítios de ligação para o ATP, assim como sítios de ligação para a actina e para cátions divalentes.

A cadeia leve da miosina LC₁ é conhecida como cadeia leve essencial e a cadeia leve LC₂ é denominada regulatória. Estas duas cadeias leves são homólogas à calmodulina, parvalbumina e troponina C (COOKE, 1997) que são proteínas descritas mais adiante neste trabalho. Acredita-se que as cadeias leves são fundamentais na regulação da contração muscular.

As moléculas de miosina agregam-se para formar o filamento grosso, de tal modo, que três pares de cabeça S₁ projetam-se do filamento grosso, em intervalos de 14mm. Cada conjunto de projeções apresenta-se alternado a outro num ângulo de 120°, de tal modo que a repetição axial ocorra a cada 42,9mm (MOSS e HOFMANN, 1992).

A miosina pode ser dividida em dois fragmentos denominados meromiosina pesada e meromiosina leve (COOKE, 1997). A meromiosina pesada contém a cabeça globular (S-1) e um bastão flexível denominado S₂. Esse bastão é responsável por unir a porção S₁ ao restante da molécula de miosina. A meromiosina leve é um bastão rígido que forma a sustentação dos filamentos grossos (Figs. 2 e 3).

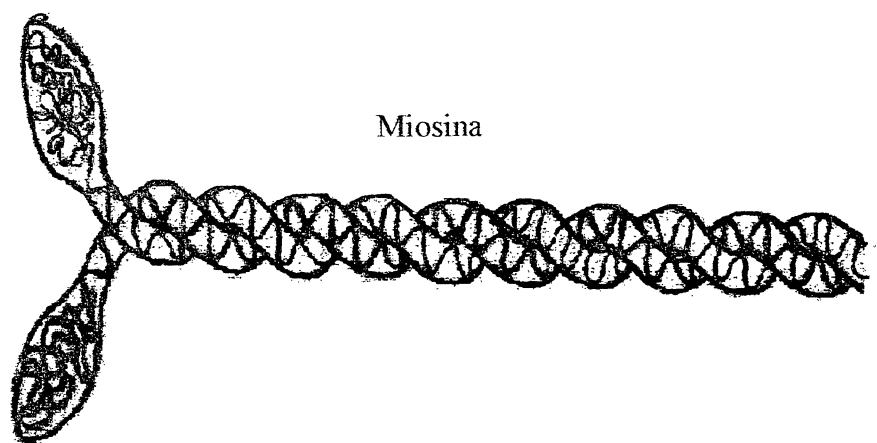


Figura 2 - Estrutura da molécula de miosina.

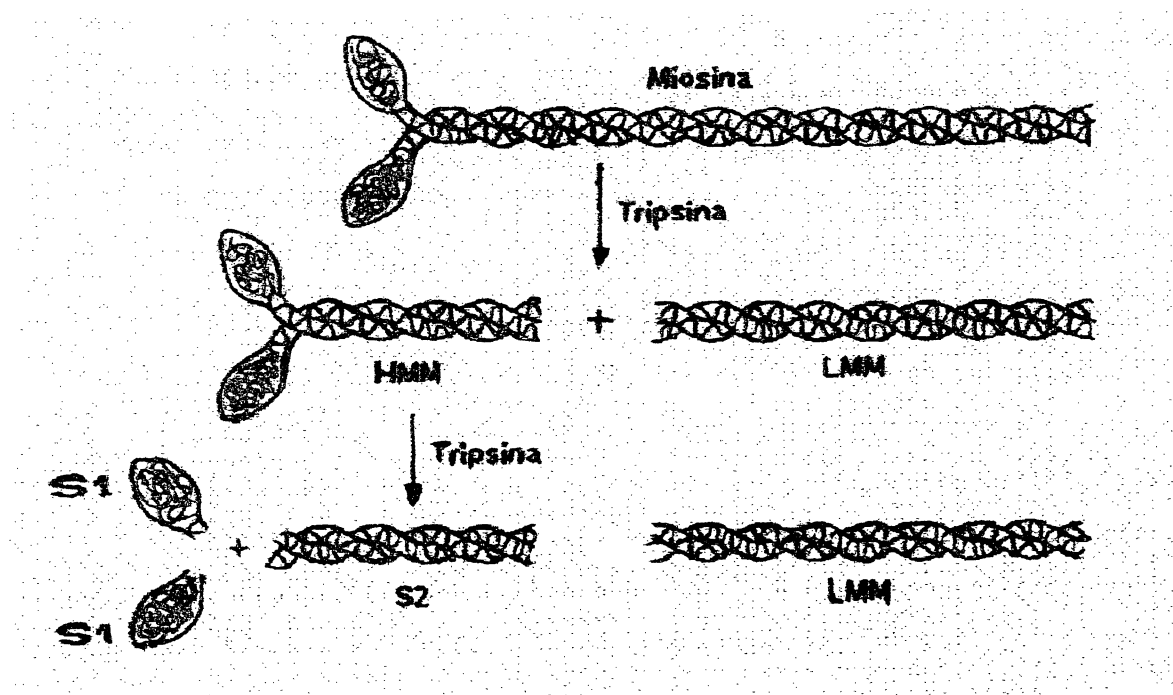


Figura 3 - Meromiosina leve e meromiosina pesada

1.3 Filamentos Finos do Sarcômero

São formados pela interação de três proteínas: actina, tropomiosina e troponina na razão de 7:1:1. O filamento fino representa o principal sítio para o mecanismo de regulação exercido pelos íons cálcio (GORDON *et al.* 2000).

1.3.1 Actina

O monômero de actina consiste em quatro subdomínios (com um nucleotídeo fortemente ligado à abertura central da molécula) (COOKE, 1997). Os subdomínios 3 e 4 formam o cerne do filamento, enquanto os subdomínios 1 e 2 projetam-se para a periferia. O subdomínio 1 apresenta as terminações NH_2 e COOH da molécula de actina e desempenha papel fundamental nas interações com a miosina (MILLER *et al.* 1995). Os dois subdomínios internos são conectados com os dois subdomínios mais externos somente por meio de duas cadeias polipeptídicas, sugerindo uma possível flexibilidade dentro do monômero de actina.

A actina é o componente mais abundante dos filamentos finos (Fig. 4) (COOKE, 1997). Sob condições de baixa força iônica, essa proteína existe na forma globular (monômero), denominada actina G, com massa molecular de 42Kda e formada por 365 resíduos de aminoácidos. Em condições fisiológicas de força iônica e na presença de Mg-ATP, os monômeros de actina G polimerizam-se formando um longo filamento denominado actina F (MOSS e HOFMANN, 1992).

O filamento de actina F apresenta entre 6 e 7nm de espessura e possui uma sequência repetitiva de monômeros a cada 35,5 μm , formando uma torção completa a cada 72 μm , sendo que quatorze monômeros de actina formam um passo do filamento helicoidal. Os filamentos de actina ficam fixos à linha Z por suas extremidades. A proteína estrutural dessa região é a α -actinina, que faz ligação cruzada da actina (ALBERTS *et al.* 1997).

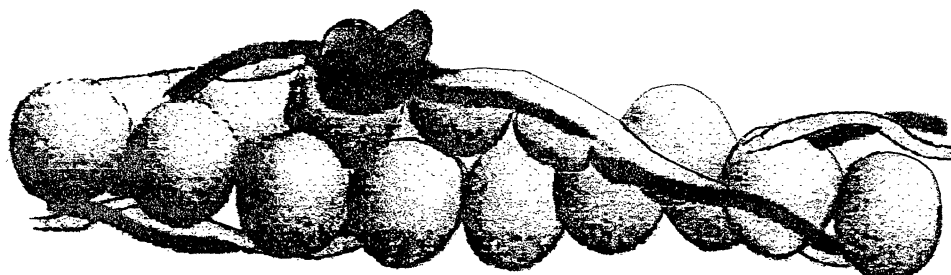


Figura 4 – Filamento fino em que está demonstrada a molécula de actina

1.3.2 Tropomiosina

A tropomiosina apresenta morfologia longa e fina, com cerca de 40nm de comprimento, formada por duas cadeias polipeptídicas, uma enrolada sobre a outra, cuja estabilidade é mantida por meio de interações hidrofóbicas entre resíduos de aminoácidos apolares, bem como por interações eletrostáticas entre resíduos de aminoácidos carregados (MOSS e HOFMANN, 1992).

Todas as moléculas de tropomiosina unem-se umas as outras pelas extremidades, para formar filamentos longos que se localizam ao longo do sulco existente entre os dois filamentos de actina F. Cada heterodímero de tropomiosina mantém íntimo contato com sete subunidades de actina, mas a sequência de aminoácidos da molécula de tropomiosina revela a existência de 14 regiões repetidas, dotadas de resíduos ácidos e não-polares que podem servir como sítios de ligação para a actina.

As subunidades α e β da actina são formadas por 284 resíduos de aminoácidos e apresentam o resíduo cisteína (Cis) na posição 190. Entretanto a subunidade β apresenta um aminoácido Cys na posição 36. Cada subunidade

apresenta 33Kda, sendo homólogas, mas não idênticas (GARRET E GRISHAM, 1996). Estas subunidades são designadas por α e β e provavelmente são originadas, em parte, da atividade de dois genes que apresentam variabilidade de expressão em diferentes tipos musculares.

1.3.3 Troponina

Em associação à tropomiosina existe um complexo protéico que apresenta capacidade de ligar-se aos íons cálcio, denominado troponina (MOSS e HOFMANN, 1992). A troponina apresenta um complexo formado por três proteínas ditas regulatórias, denominadas troponina C (TnC) que apresenta sítios específicos para a ligação com íons cálcio; troponina T (TnT) que é responsável pela ligação do complexo troponina / tropomiosina no filamento fino; troponina I (TnI) envolvida na inibição da interação actina / miosina, inibindo a atividade atpase - Mg^{2+} da actomiosina (POTTER *et al.* 1995).

A troponina C (TnC) é formada por 159 resíduos de aminoácidos tendo peso molecular calculado de 18Kda. Apresenta duas regiões globulares, uma NH_2 terminal e outra $COOH$ terminal, conectadas por uma longa hélice central. Cada região contém dois sítios de ligação para os íons cálcio. Esses sítios, com alta afinidade para o íon cálcio e com relativa afinidade ao íon magnésio, situam-se na porção carboxi-terminal e ligam-se ao cálcio e magnésio. São denominados sítios estruturais, porque a ligação dos íons magnésio-cálcio a eles aumenta a interação entre a troponina C e a troponina I, bem como a ligação da troponina C ao filamento fino. Os sítios com baixa afinidade ao íon cálcio, estão localizados na porção amino-terminal, sendo designados de domínios I e II. Estes domínios são dotados de sítios específicos para os íons cálcio, com alta seletividade para o íon cálcio em relação ao íon magnésio.

A ligação dos íons cálcio aos sítios III e IV é suficientemente forte. Provavelmente eles permaneçam preenchidos em condições de repouso, quando a concentração intracelular de íons cálcio é de 10^{-5} M. Os sítios I e II, por apresentarem baixa afinidade ao íon cálcio, ficam vazios quando o músculo está em repouso (ZOT e POTTER, 1992).

A molécula de troponina C apresenta 70% de homologia com a calmodulina, que é a proteína responsável por mediar as respostas dependentes de cálcio em todas as células, inclusive a ativação da miosina no músculo liso (ZOT e POTTER, 1992). Assim, a troponina C pode ser vista como uma forma especializada de calmodulina que desenvolveu sítios para ligação permanente das troponinas T e I, assegurando uma resposta extremamente rápida a um aumento nas concentrações de cálcio.

A troponina C (Fig. 5) é muito ácida devido ao elevado conteúdo de resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico (TSUDA *et al.* 1999).

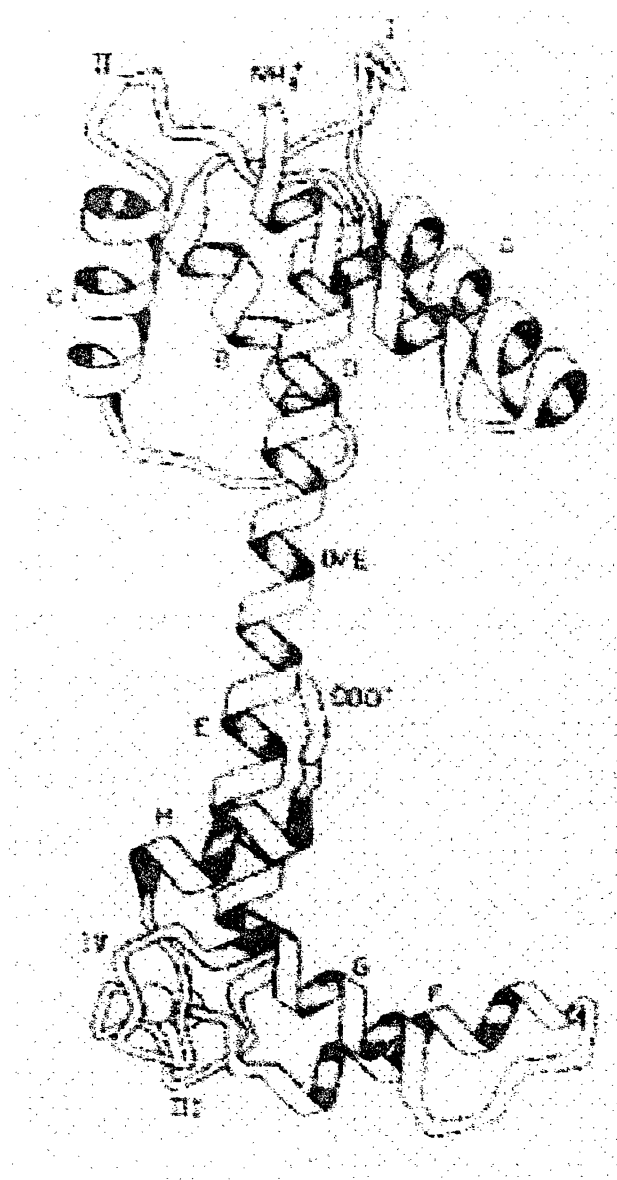


Figura 5 – Molécula de Troponina indicando as regiões NH₂ terminal e COOH terminal, conectadas por uma longa hélice central

A molécula de troponina T (TnT) consiste em 259 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular de 30KDa. Esta proteína é altamente polar, com uma seqüência de resíduos (aminoácidos) ácidos próximos da região amino-terminal (resíduos 1-39) e uma predominância de resíduos básicos próximos da porção carboxi-terminal (resíduos 221-259) (ZOT e POTTER, 1992). Esta molécula é fundamental na manutenção do complexo Tn-Tm-actina. Contudo, sua atividade não está restrita apenas à ligação TnC-TnI com o complexo Tm-actina, mas também, na ativação cooperativa dos filamentos finos (FARAH *et al.* 1999). Na troponina T (TnT) encontra-se um domínio amino-terminal que interage com a tropomiosina e um domínio carboxi-terminal, com aspecto globular, que interage com a tropomiosina, troponina I e troponina C.

A troponina I (TnI) apresenta um resíduo de triptofano na posição 158, dois resíduos de tirosina nas posições 43 e 79 e três resíduos de cisteína nas posições 48, 64 e 133. A interação da molécula de troponina I com a molécula de troponina C ocorre na presença ou ausência de íons cálcio (ZOT e POTTER, 1992). A molécula de troponina I (TnI) está envolvida na inibição da interação da actina com a miosina, inibindo a atividade atpásica do complexo actomiosina, e é de fundamental importância para a estrutura deste complexo.

1.4 Mecanismo Molecular da Contração Muscular

De acordo com a Fig. 6, a produção de força pelo sistema contrátil resulta de interações cíclicas da cadeia pesada da miosina (pontes transversas) com a actina (HUXLEY, 1957; NAYLOR *et al.* 1985).

Empregando-se a técnica de microscopia eletrônica, verificou-se que o encurtamento do sarcômero não é acompanhado pelo encurtamento dos filamentos contráteis e a interação cíclica das pontes transversas da miosina, existentes na região de sobreposição dos filamentos grossos com os finos (banda A), provoca o deslizamento da actina sobre a miosina (HUXLEY, 1957; HUXLEY e HANSON, 1954). Este deslizamento resulta na redução da região em que se encontram os filamentos grossos (zona H) e a banda I. A interação das pontes transversas da miosina com a actina, é regulada pela presença das proteínas do

sistema regulatório troponina-tropomiosina, encontradas no filamento finos, de íons cálcio (WANG *et al.* 1992).

Huxley (HUXLEY e HANSON, 1954; HUXLEY, 1957), propõe que haveria um estado no qual a actina estaria desligada da miosina, que não produziria força, e um outro estado em que o complexo actina-miosina fortemente ligado, seria responsável pela geração de força. Mais tarde foi demonstrado que a melhor forma de explicar a interação da actina com a miosina e, por conseqüência, a transdução de energia química em mecânica ocorreria em múltiplas etapas. Estas etapas são consideradas o ciclo de pontes transversas e foram descritas por Goldmann (GOLDMANN e BRENNER, 1987). Segundo o modelo descrito por Goldmann acredita-se que na ausência de actina e na presença de MgATP, uma parte da população de miosinas encontram-se ligadas ao ATP formando o complexo M.ATP. Em decorrência da atividade atpásica da cabeça da miosina forma-se o complexo M.ADP.Pi. Na ausência de actina este complexo é bastante estável porque a ligação do ADP.Pi é muito forte. Com a lenta liberação do íon fosfato forma-se o complexo M.ADP.A. A seguir, com a liberação do ADP deste complexo, a miosina volta a combinar-se com a molécula de ATP, reiniciando um novo ciclo (GOLDMANN e BRENNER, 1987).

Na presença de actina a miosina forma o complexo AM. Na presença de concentrações fisiológicas de ATP, forma-se o complexo AM.ATP que entra em equilíbrio com o complexo AM. Devido a atividade atpásica da cabeça da miosina, forma-se o complexo AM.ADP.Pi, o qual forma equilíbrio dinâmico com o complexo M.ADP.Pi. Neste estado a cabeça da miosina situa-se em um ângulo de 90° em relação a sua cauda (MOSS e HOFMANN, 1992; COOKE, 1997). A presença da actina acelera a liberação do fosfato inorgânico. Determinando a formação do complexo fortemente ligado AM.ADP e AM.ADP. Com a liberação do ADP, forma-se o complexo AM. Durante a transição do estado AM.ADP para AM a cabeça da miosina passa da posição de 90° para 45° em relação a sua cauda, tracionando o filamento fino de actina, produzindo força ou o encurtamento do sarcômero. O estado AM é definido como estado de rigor. A morte causa rigidez muscular ("rigor mortis"), porque a depleção de ATP leva à união permanente da ponte cruzada (complexo AM). Na presença de ATP ocorre ligação desse nucleotídeo, a cabeça da miosina e o complexo AM se dissocia rapidamente e

forma novamente o complexo M.ATP e a cabeça da miosina retorna a posição original de 90°. Caso se mantenham os níveis suficientes de cálcio e ATP ocorrerá um novo ciclo de pontes transversas. A passagem do complexo AM para MATP+A é rápida, pois a cabeça da miosina apresenta alta afinidade pelo ATP, além disso, a ligação do ATP à cabeça da miosina provoca redução da afinidade da miosina pela actina (GOLDMANN E BRENNER, 1987).

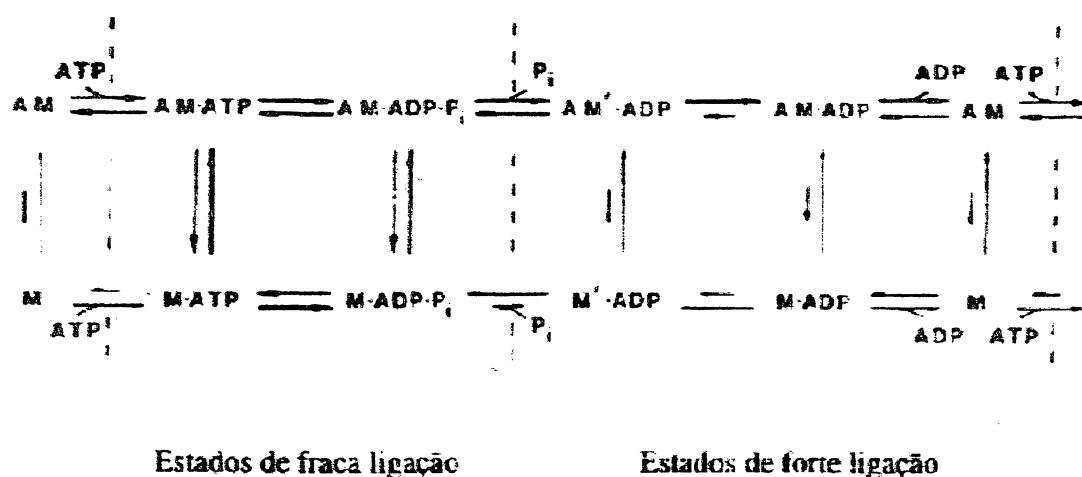


Figura 6 – Modelo de ciclo de pontes transversais

Em fibras musculares a presença do complexo troponina / tropomiosina atua regulando a interação da cabeça da miosina com a actina (EBASHI, 1980). Acredita-se também, que a interação da actina com a miosina nos estados AMATP e AMATP.P_i existam como estados de fracas ligações (BRENNER, 1987). Este estado caracteriza-se pela baixa afinidade da cabeça de miosina pela actina, rápido equilíbrio entre a associação e dissociação da actina e a ligação da cabeça da miosina com a actina na ausência de íons cálcio. Na presença de íons cálcio a interação da actina com a miosina torna-se forte acelerando a liberação do P_i e a produção de força ocorre nos estados AMADP, AM.ADP e AM (BRENNER, 1987). Também a velocidade de transição dos estados de fraca ligação para o estado de forte ligação entre a actina e a miosina depende da presença de íons cálcio (KLEIN *et al.* 1999).

1.5 Receptores Envolvidos no Processo de Acoplamento Excitação-Contração

Tanto os receptores raionidínicos (RiRs) como receptores dihidropiridínicos (DHPR) são componentes fundamentais na transdução do sinal elétrico criado pela despolarização do sarcolema para o retículo sarcoplasmático, desencadeando a contração muscular pela liberação do cálcio armazenado nos estoques intracelulares (DULHUNTY *et al.* 1999).

1.5.1 Receptores Dihidropiridínicos (Dhpr)

Os receptores dihidropiridínicos, localizados nas membranas dos túbulos transversos, são responsáveis pela iniciação do mecanismo de acoplamento excitação-contração no músculo estriado esquelético (ADAMS, 1990; RIOS 1987; TANABE, 1988). Neste músculo, os receptores dihidropiridínicos estão dispostos formando tétrades (FRANZINI-ARMSTRONG, 1997) mantendo íntimo contato com a membrana da cisterna terminal do retículo sarcoplasmático, onde estão localizados em alta densidade os receptores raionidínicos (PROTASI *et al.* 1998).

Estes receptores são membros de uma família de canais iônicos dependentes de voltagem que incluem canais de Na^+ , Ca^{2+} e K^+ (TANABE *et al.* 1990). O termo receptor dihidropiridínico é usado pela afinidade desses receptores por derivados dihidropiridínicos, que bloqueiam a atividade desses canais. Um exemplo disso é a nifedipina.

No processo de excitação-contração os receptores dihidropiridínicos atuam como sensores de voltagem, ou seja, mudanças conformacionais ocorrem nesses receptores gerando o movimento de carga transmembrana, provocadas pela alteração de voltagem do sarcolema (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997).

Os receptores DHP são heteropentâmeros constituídos por cinco subunidades protéicas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ e δ . A subunidade $\alpha 1$ é estruturalmente semelhante aos canais de sódio voltagem-dependentes, apresentando quatro domínios (I-IV), cada um contendo seis segmentos transmembrana (S1-S6)

(TANABE *et al.* 1987). O segmento transmembrana S4, em cada um dos quatro domínios, contém resíduos de aminoácidos carregados positivamente (ARg ou LiS) e os movimentos dessas seqüências, em resposta à despolarização do sarcolema, pode determinar a abertura do canal (TANABE, 1990). Em músculos estriados esqueléticos a subunidade $\alpha 1$, entre os domínios II - III dos receptores DHPR, é crítica para o mecanismo de acoplamento excitação-contração, pois realiza interações com os receptores raionidínicos (ZHU *et al.* 1999). Diversos estudos indicam que a subunidade $\alpha 1$ é a porção da molécula sensível a dihidropiridina, formadora de canal e que atua como sensor de voltagem (FRANZINI-ARMSTRONG, 1997). Três isoformas $\alpha 1$ foram identificadas em músculo esquelético e uma no músculo cardíaco. As diferenças entre o mecanismo de acoplamento excitação-contração no músculo esquelético e cardíaco são determinadas pelos tipos de isoformas dos receptores DHPR presentes nestas células.

As alças III e IV desempenham um papel fundamental no mecanismo de acoplamento excitação-contração. A interação entre os receptores raionidínicos e as alça III e IV dos receptores DHPR (Fig. 7) poderia apresentar um papel de inativação da liberação de íons cálcio por meio do receptor raionidínico, durante a repolarização do sarcolema (FLEISCHER e INUI, 1989; BERS e FILL, 1998). A função das demais subunidades não está totalmente esclarecida. A subunidade $\alpha 2$ auxilia na expressão funcional de $\alpha 1$; a subunidade de β colabora para a cinética apropriada dos canais de cálcio presentes em músculo esquelético e δ é um fragmento de $\alpha 2$ (TANABE *et al.* 1990; CALLAWAY *et al.* 1994). A associação da subunidade β com $\alpha 1$ aumenta a eficiência do acoplamento entre percepção da alteração de voltagem e abertura do canal, bem como o aumento substancial na amplitude da corrente e a associação de $\alpha 2\delta$ com $\alpha 2\beta$ aumenta a amplitude da corrente e a taxa de inativação.

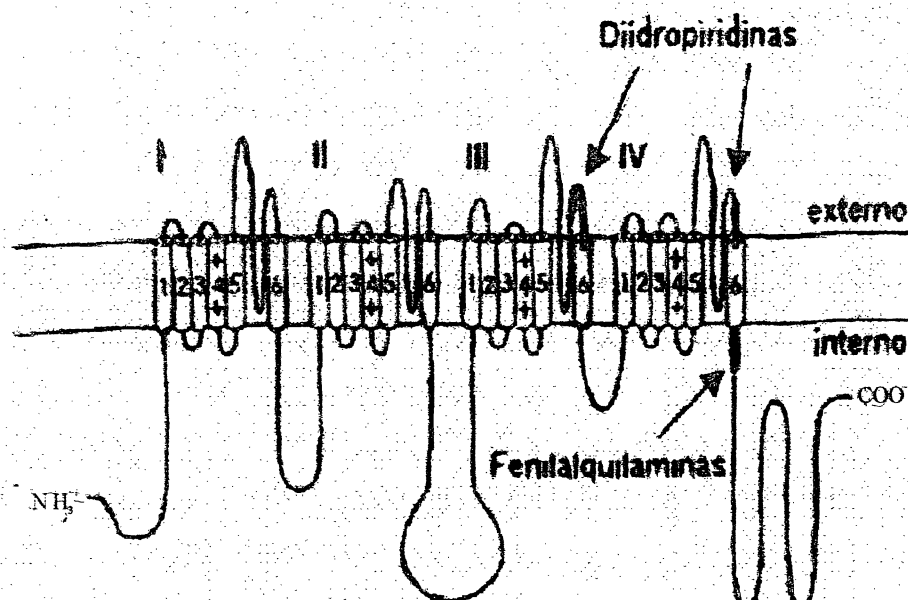


Figura 7 – Receptor DHPR

1.5.2 Receptores Raionidínicos (RiRs)

Os receptores raionidínicos são homotetrâmeros compostos por quatro subunidades, cada uma com um peso molecular de cerca de 560KDa. Reconstruções tridimensionais de microscopia crio-eletrônica fornecem imagens das estruturas do canal raionidínico mostrando que são altamente simétricas, com cada polipeptídeo RiRs contribuindo com um quarto do complexo total (FRANZINI-ARMSTRONG E PROTASI, 1997). Estão localizados no retículo sarcoplasmático, de músculo estriado (ou retículo endoplasmático em outras células. Apresenta uma alta afinidade pela raionidina que é um alcalóide neutro extraído de plantas (FRANZINI-ARMSTRONG, 1997 e MILLER. C, 1986), e cujos efeitos específicos têm sido atribuídos à liberação e bloqueio de cálcio do retículo sarcoplasmático, promovendo a modificação da tensão nos músculos cardíaco e liso (CORONADO *et al.* 1994). Os receptores raionidínicos têm uma considerável semelhança quanto à sequência e estrutura geral com outros canais intracelulares como o receptor 1, 4, 5 trifosfato de inositol (CORONADO, 1994). Entretanto, têm

uma maior condutividade em relação aos receptores 1, 4, 5 trifosfato de inositol e, por este motivo, estão envolvidos em situações que necessitam de rápida liberação de grandes quantidades de cálcio, como no mecanismo de acoplamento excitação-contração em músculo estriado (FRANZINI-ARMSTRONG, 1997). Os receptores para IP3 serão descritos mais adiante neste trabalho.

Encontram-se receptores raionidínicos localizados em alta densidade, em uma região especial da membrana do retículo sarcoplasmático, situada na face juncional dessa membrana que é denominada retículo sarcoplasmático juncional (FRANZINI-ARMSTRONG, 1997). Nessa região os receptores raionidínicos estão associados direta ou indiretamente, com outros componentes estruturais como a calsequestrina, triadina e junctina, com as quais interage funcionalmente (FRANZINI-ARMSTRONG, 1997; CORONADO *et al.* 1994), e que serão descritas mais adiante neste trabalho.

Três formas de receptores rianodínicos (RiRs) têm sido identificadas: RiR1, expresso predominantemente no músculo esquelético; RiR2, predominante no músculo cardíaco; e RiR3 expresso em outros músculos especializados e tecidos como o cérebro. A condutância para o cálcio é um pouco maior no RiR1 esquelético (120pS) do que no RiR2 cardíaco, que é de 100pS. Em relação à ativação e inativação dependente de cálcio, o RiR2 é mais sensível que o RiR1 (MEISSNER *et al.* 1991). As estruturas tetramétricas do RiR1 e RiR2 são estabilizadas por uma proteína associada ao canal conhecida como a proteína de ligação do FK506 (FKBP). Brillantes (BRILLANTES *et al.* 1994), demonstrou que uma proteína de 12Kda (FKBP12) está estreitamente associada com o RiR1 e modula a função do canal, possivelmente pelo aumento da cooperação entre suas quatro subunidades. Isto permite que o canal se abra em um estado de condutância máxima e se feche hermeticamente, prevenindo a perda de cálcio do retículo sarcoplasmático. A taxa molar da FKBP12 para RiR1 em preparações altamente purificadas de RiR1 é de 1:1, indicando que uma molécula FKBP está associada com cada subunidade do canal liberador de cálcio (GROH *et al.* 1999). A FKBP é o receptor citosólico para as drogas imunossupressoras FK506 e rapamicina que inibem a atividade da prolil isomerase da FKBP (BRILLANTES *et al.* 1994) e podem dissociar a FKBP dos receptores raionidínicos. A rapamicina e o FK506 aumentam a sensibilidade dos RiRs para agonistas como a cafeína e

podem ser a causa de disfunção cardíaca associada com alta dose de terapia imunossupressora por promover o vazamento de cálcio do retículo sarcoplasmático. O papel da atividade da prolil isomerase do FKBP em regular a função do RiRs permanece incerto e vários modelos têm sido propostos para explicar como o canal é modulado por esta associação com o FKBP. Os RiR ainda são modulados por calmodulina e solutos citoplasmáticos (FRANZINI-ARMSTRONG, 1997). A calmodulina possui a capacidade de inibir o canal de liberação porque reduz o tempo de abertura do canal sem efeito aparente na condutância isolada do canal (SMITH, CORONADO e MEISSNER, 1989).

O receptor raionidínico apresenta uma grande região hidrofílica NH₂ - terminal que constitui a porção citoplasmática da molécula ou pé, parecendo ser o ponto de acoplamento mecânico entre esses receptores e os receptores dihidropiridínicos (FRANZINI-ARMSTRONG, 1997). Esta estrutura em forma de pé, pertence ao RiRs (FLEISHER *et al.* 1989), promovendo a interação física entre as membranas do túbulo transverso e da cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (FRANZINI-ARMSTRONG *et al.* 1983). A molécula raionidínica tem um complexo contorno com vários encaixes que se interdigitam com as moléculas vizinhas, o que permite a formação de grupos de receptores raionidínicos (FRANZINI-ARMSTRONG, 1994), permitindo, dessa forma, a abertura simultânea de vários canais de cálcio, otimizando o mecanismo de contração muscular (BERS e FILL, 1998).

A liberação do cálcio intracelular envolve a ativação dos receptores da raionidina (RiRs) ou receptores do 1,4,5 trifosfato de inositol (IP₃RS) (CORONADO, 1994). Como os RiRs, os canais IP₃RS são tetrâmeros compostos por quatro subunidades, cada uma com cerca de 300KDa. A função do IP₃R é regulada por dois grandes caminhos de sinalização celular: o segundo mensageiro IP₃ ativa o canal e a fosforilação pela proteína tirosina quinase aumenta sua probabilidade de abertura (BRILLANTES *et al.* 1992). Três formas do IP₃RS (tipos 1,2 e 3) têm sido caracterizadas por clonagem de DNA. Há uma grande gama de células que expressam uma das formas do IP₃R e há várias células que expressam todos os três tipos (BRILLANTES *et al.* 1994). Durante o estágio final da falência cardíaca o RNAm e a proteína do RiR2 são inibidos, enquanto o IP₃R1 é ativado, sugerindo que alterações nos níveis dos canais

liberadores de cálcio podem contribuir para os defeitos na homeostasia do cálcio (BRILLANTES *et al.*, 1994; GO *et al.*, 1995).

Não há evidências de uma organização em tríades dos receptores dihidropiridínicos no músculo cardíaco, o que sugere a ação do princípio cálcio induzindo a liberação de cálcio (RIOS, 1991; BLOCK, 1996).

1.5.3 Demais Proteínas Associadas à Regulação da Liberação de Cálcio do Retículo Sarcoplasmático

Outras proteínas têm sido associadas à regulação da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático do músculo esquelético, em conjunto com os RiRs do túbulo T e a calmodulina. Estas proteínas são triadina, calsequestrina, anexina IV, S-100, gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase, aldolase, proteína de acoplamento FK506 e calpaína.

A triadina é uma proteína de membrana do retículo sarcoplasmático que está envolvida na junção do RiRs do retículo sarcoplasmático e túbulo T (CAMPBELL *et al.* 1993). A outra é a calsequestrina que é uma proteína de ligação de cálcio do retículo sarcoplasmático do músculo estriado esquelético e está localizada nas cisternas terminais dessa região. Esta proteína, além de aumentar a capacidade de armazenamento de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, também regula a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (CAMPBELL *et al.* 1993). A anexina IV é uma proteína de ligação do cálcio sendo capaz de modular a atividade do canal de liberação de cálcio, induzindo a liberação de cálcio, aumentando a probabilidade de abertura desse canal e o tempo médio de abertura (MEISSNER, 1994). A S-100 é uma proteína citoplasmática que estimula a liberação induzida por cálcio em concentrações de 5mM (MEISSNER, 1994). O gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase promove a associação do túbulo T isolado com vesículas juncionais do retículo sarcoplasmático. Acredita-se que é responsável por estabilizar a ligação entre os receptores dihidropiridínicos do túbulo T e os RiRs do retículo sarcoplasmático (MEISSNER *et al.* 1997). A aldolase é uma proteína liberada de tríades pelo IP3 sem apresentar um papel funcional na liberação de cálcio do retículo

sarcoplasmático (MEISSNER, 1994). A proteína FK506 afeta as atividades enzimáticas que desempenham papel na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, inibindo a ação da proteoquinase C e a calmodulina ativada (WANG *et al.* 1993; BEST, 1992). A calpaína é uma protease endógena cálcio dependente, que atua impedindo a inativação do RiRs (WANG *et al.* 1993).

1.6 Algumas Drogas Utilizadas para o Estudo do Mecanismo de Acoplamento Excitação-Contração

Várias drogas, dentre elas a cafeína, os anestésicos e os íons podem ser utilizadas para o estudo do mecanismo de acoplamento excitação-contração. Estas drogas possuem capacidade de modificar a atividade do canal de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (LEAL-CARDOSO *et al.* 1998; ALBUQUERQUE *et al.* 1995; LEAL-CARDOSO e FONTANELES, 1999).

No presente trabalho foram utilizados a cafeína, o perclorato e o anetol. As características e a ação dessas substâncias no mecanismo de acoplamento excitação-contração (AEC) serão descritas a seguir.

A cafeína (1, 3, 7 trimetilxantina), é um alcalóide extraído dos grãos de café (HERRMANN-FRANK *et al.* 1999). Nos experimentos relacionados ao estudo do mecanismo de AEC esta droga é utilizada para estimar a quantidade de cálcio que está armazenada no retículo sarcoplasmático, de acordo com a resposta da força gerada em função de sua presença (NOSEK *et al.* 1997).

Estudos anteriores (AXELSON *et al.* 1958), indicam que a liberação de cálcio induzida pela cafeína não é dependente do cálcio externo e que esta substância não causa despolarização da membrana e não altera o potencial de ação (SANDOW, 1965). Estudos recentes indicam que ocorre uma pequena mudança no movimento de carga intramembrana em potenciais mais negativos (SZÜCS *et al.* 1991).

Em grande parte dos experimentos ficou comprovado que a cafeína atua nos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS), e que a principal região de atuação é na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático. Nesta região do

retículo sarcoplasmático estão localizadas as maiores concentrações dos RiRs (WEBER e HERTZ, 1968).

A cafeína também atua em conjunto com o ATP e com o cálcio e esta interatividade resulta no aumento da afinidade de ligação da raionidina pelos RiRs, levando a abertura deste canal de cálcio (SARKOZI *et al.* 1996). O que ocorre entre estas substâncias é uma ação cooperativa que resulta num aumento da sensibilidade dos RiRs por ativadores fisiológicos (ROUSSEAU *et al.* 1998). Na ausência de cálcio, a atividade da cafeína ativar os RiRs é dose-dependente (concentrações de cafeína acima de 5mM) (HERRMANN-FRANK *et al.* 1999).

O íon perclorato é outra substância freqüentemente utilizada no estudo do mecanismo de AEC e o seu principal efeito comprovado é o de potencializar a contração muscular esquelética (CSERNOCH *et al.* 1999). É responsável por aumentar a permeabilidade do retículo sarcoplasmático ao íon cálcio e produzir uma maior eficiência no acoplamento entre os sensores de voltagem (DHP) e os RiRs (CSERNOCH *et al.* 1999). Estes efeitos do perclorato (ClO_4^-) não podem ser atribuídos à despolarização do sarcolema e provavelmente ocorrem por induzir mudanças funcionais e conformacionais nos RiRs (LÜTTGAU *et al.* 1983).

Estudos relatam que o canal de liberação de Ca^{+2} do Rs (RiR) pode ser o sítio primário pelo qual o perclorato e outros ânions potencializadores afetam o AEC em músculos esqueléticos. Provavelmente o Pi (fosfato inorgânico) poderia modular a atividade do RiR. Por este motivo é considerado um modulador endógeno deste canal (FRUEN *et al.* 1994b). O Pi possui efeito no RiR em músculo esquelético mas não apresenta efeito em músculo cardíaco. Este fato foi comprovado porque seu efeito depende da ligação do Pi com uma isoforma específica do RiR presente no músculo esquelético (FRUEN *et al.* 1994b). Através destas observações, em que 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-RiR (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-RiR (CSERNOCH *et al.* 1999).

O perclorato (2-20mM) 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 RiR). Muitos estudos mostram que o perclorato atua em múltiplos sítios em músculo esquelético, que 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 RiR (MA *et al.* 1993; CSERNOCH *et al.* 1999), em que 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 RiR e o DHPR. Isso faz pensar na possibilidade de que o perclorato tenha um efeito secundário no DHPR, em decorrência da transmissão do sinal proveniente do RiR para o DHPR. Uma explicação para esse fato seria de que o perclorato poderia afetar a propagação da corrente de transmissão entre RiR / DHPR. Este mecanismo sugeriria que a transmissão do sinal é alostérica, entre estes pelo contato receptores (MA *et al.* 1993; CSERNOCH *et al.* 1999). Esta interação alostérica entre DHPR-RiR não é de um para um, visto que estruturalmente a proporção destes receptores são distintas (RIOS *et al.* 1993). Acredita-se também que alguns RiRs permaneçam fechados (abertura relutante) mesmo após a conexão com o DHPR ter mudado a conformação dos RiRs. A presença do perclorato faz esta interação mais eficiente, e assim, acredita-se que o número de canais relutantes diminui (MA *et al.* 1993; CSERNOCH *et al.* 1999). Os diferentes efeitos das ferramentas farmacológicas utilizadas para se estudar o mecanismo do 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 e 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 à 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 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 e LÜTTGAU, 1988; RIOS e PIZARRO, 1991).

Em um estudo com tríade (junção das membranas do sistema tubular transverso e das membranas da cisterna terminal do Rs adjacentes), foi realizada a monitoração da mudança conformacional dos RiRs (YANO *et al.* 1995), mostrando que quando se utilizavam baixas concentrações de perclorato ($\leq 10\text{mM}$), ele era capaz de liberar cálcio do Rs somente quando o túbulo T estava quimicamente despolarizado. Ainda, que o perclorato em concentrações entre 30-100mM 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 ($\leq 10\text{mM}$) 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 do cálcio do Rs; em altas concentrações (30-100mM) produz uma mudança conformacional no RiR, liberando cálcio do Rs, independente se o túbulo T estar despolarizado ou não (YANO *et al.* 1995).

Nesse mesmo estudo, utilizando 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 raionidina pelo RiR, enquanto que em baixas concentrações o perclorato não teve nenhum efeito (GONZALEZ e RIOS, 1993). Diante desses dados, sugere-se que o efeito do perclorato na ativação do RiR ocorre depois do DHPR detectar a alteração na voltagem. Porém, não se pode excluir a possibilidade alternativa de que a despolarização possa induzir uma mudança conformacional no RiR, e que

pode aumentar a afinidade do RiR pelo perclorato, permitindo sua atuação no RiR em altas concentrações (YANO *et al.* 1995).

O anetol é um dos componentes predominantes no extrato de óleo essencial do *croton zehntneri*, uma planta nativa do nordeste brasileiro (ALBUQUERQUE, 1995). Uma de suas principais características é um forte e agradável odor. Extratos de sua casca e folhas são usados em perfumes e como adoçantes em alimentos e bebidas. A medicina popular também emprega esses extratos como sedativos e para tratar os distúrbios da função gastrointestinal (ALBUQUERQUE, 1995).

Os óleos essenciais derivados dessa planta (anetol e estragol) causam bloqueio do AEC em músculo esquelético em concentrações entre 0,3-3,0mM, por um mecanismo não totalmente elucidado.

Na estimulação direta de diafragma de rato, o anetol não induziu uma significativa alteração no processo de contração (ALBUQUERQUE *et al.* 1995). Contrações induzidas por cafeína nos músculos reto abdominal e sartório de sapo foram ampliados pelo anetol. Foi concluído que o anetol pode ter dois sítios de ação nas fibras musculares: o primeiro em uma etapa posterior à junção neuromuscular, bloqueando a transmissão neuromuscular e o segundo no retículo sarcoplasmático, aumentando o cálcio mioplasmático.

Estudos realizados comprovaram que o anetol bloqueia a contração do músculo esquelético resultante da estimulação nervosa anteriormente à excitação muscular (LEAL-CARDOSO *et al.* 1994). Constatou-se ainda, que o anetol bloqueia a contratura induzida por potássio.

1.7 Objetivos

- 1) Investigar o processo de excitação-contração, empregando substâncias que interferem com o mesmo;
- 2) elucidar as ações do perclorato isolada e em combinação com o anetol no processo de acoplamento excitação-contração em fibras musculares intactas;

3) elucidar as interações destes dois compostos ao nível subcelular (Rs e sistema contrátil) empregando-se a técnica de fibra permeabilizada com saponina e Triton X-100.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção e Sacrifício dos Animais

Nos experimentos foram utilizados músculos sartório de *rana catesbiana* (rã) de ambos os sexos, pesando de 100 a 200g, fornecidas por um criador local, mantidas no ranário do biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e alimentadas *ad libitum* (n=6). A dissecação do músculo foi realizada após descerebração do animal. Durante o processo, o músculo foi constantemente umedecido com Solução de Ringer, com a seguinte composição (em mM): CaCl_2 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.

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 fixadas ao fundo da câmara e a outra conectada a uma alavanca para o registro em um quimógrafo (Zimmermann Leipzig - série 1878). O registro foi feito em papel com 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 Anetol em Músculo Sartório Intacto de Anfíbio

O encurtamento muscular obtido em diferentes condições experimentais foi normalizado para aqueles induzidos por 100mM K⁺ (contratura potássica).

O músculo foi incubado em Ringer normal e anetol 1mM por 15 minutos. Após o período de incubação, foi adicionada solução de 100mM de potássio e anetol 5 µg/ml. Quando a contração atingiu sua amplitude máxima a solução foi substituída por Ringer normal (Vide tabela 1) e o músculo permaneceu em repouso por 15 minutos. Este procedimento foi repetido para verificar os efeitos do anetol 50 µg/ml, 150µg/ml e 500µg/ml na contratura potássica.

Avaliou-se também o efeito do anetol (1mM) nas contraturas induzidas por cafeína (1mM e 3mM). A primeira contratura, induzida por 100mM de potássio, foi o controle. Em seguida, o músculo permaneceu em repouso por 15 minutos, sendo então adicionada solução 1mM de cafeína na presença de 4mM de potássio. Novamente o músculo foi mergulhado em Ringer normal por 15 minutos e nova contratura por 100mM de potássio foi induzida. Na sequência, o músculo foi incubado com anetol 1mM por 15 minutos, sendo então adicionada solução 4mM de potássio contendo cafeína 1mM e anetol 1mM. A última contratura potássica foi realizada como controle.

Para os experimentos com cafeína (3mM), foi realizada contratura inicial por 100mM de potássio como controle. Então, o músculo foi incubado com anetol 1mM por 15 minutos. Prosseguiu-se com a substituição por solução contendo anetol 1mM e 10mM de potássio. Após, músculo foi mergulhado em Ringer normal permanecendo em repouso por 15 minutos. Nova contratura potássica foi induzida por 100mM de potássio, para verificar a recuperação do músculo após a exposição ao anetol. Adicionou-se cafeína 3mM e, quando a contratura apresentou amplitude máxima, a solução foi substituída por Ringer normal (Vide tabela 1), permanecendo o músculo em repouso por 15 minutos. No seguimento, colocou-se solução de anetol 1mM por 15 minutos e, por último, substituiu-se tal solução por anetol 1mM e cafeína 3mM. Após a 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 (100mM) foi realizada após a preparação ter sido lavada com Ringer diversas vezes.

Para se avaliarem os efeitos do anetol em concentrações de 1mM, 3mM ou 6mM em concentrações crescentes de 4mM, 40mM, 80mM ou 100mM de potássio, foi realizada inicialmente uma contração com Ringer normal. Numa segunda etapa, o músculo foi exposto à mesma seqüência de concentrações de Ringer, citada anteriormente, só que agora associada ao anetol. Este anetol apresentou concentrações de 1mM, 3mM e 6mM. Ao final dos experimentos as preparações foram mantidas em Ringer normal por 30 minutos. Em seguida, foi realizada uma contratura potássica (10mM).

2.2.2 Experimentos Realizados com Perclorato em Músculo Sartório Intacto de Anfíbio

Com objetivo de se avaliar o efeito do perclorato (2mM) na contratura induzida por potássio, foram realizadas três contraturas consecutivas por K^+ (40, 80 e 100mM respectivamente). Em seguida, foram induzidas as três contraturas potássicas (40, 80 e 100mM) na presença de perclorato (2mM). Fez-se a seguir o controle posterior submetendo as preparações novamente à contratura com 40, 80 e 100mM de K^+ na ausência de perclorato.

2.2.3 Experimentos Realizados com Perclorato e Anetol em Músculo Sartório Intacto de Anfíbio

Após se ter testado o efeito do perclorato (2mM) na contratura induzida por concentrações crescentes de K^+ , avaliou-se a interação do íon perclorato (1mM, 3mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM e 60mM) e do anetol (1mM) em contrações promovidas por 4mM, 40mM, 60mM e 100mM de potássio. Fez-se inicialmente uma contratura com Ringer 100mM de K^+ no músculo que repousava em Ringer normal. Após o relaxamento do músculo, foi adicionado anetol 1mM, e

este ficou incubado por 15 minutos. Foi então realizada uma curva, adicionando-se na solução, perclorato (1mM, 3mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM 3 60mM). Novamente o músculo foi relaxado em Solução de Ringer normal e em seguida foi realizada uma contratura com Ringer 100mM de potássio. No músculo contra lateral, foi seguido o mesmo protocolo, só que o anetol (1mM) foi adicionado após a curva realizada com perclorato (1mM, 3mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM 3 60mM). Da mesma forma, o músculo foi submetido a uma contratura final com Ringer 100mM de potássio.

O mesmo protocolo foi seguido, só que as concentrações de K⁺ no Ringer, variavam entre 40mM, 60mM e 100mM. Em cada um dos experimentos, o anetol (1mM) era adicionado em um músculo, no início do experimento e no músculo contra lateral, ao final do experimento. Sempre ao final do experimento, após o músculo ficar relaxado em Ringer normal, foi realizada uma contratura com Ringer 100mM de potássio.

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 solução de pCa 8.5 com EGTA 5,0mM (tabela 2) que é considerada uma solução de relaxamento. A dissecação foi realizada à temperatura de 22°C, utilizando-se um microscópio estéreo binocular. Após a dissecação os feixes de fibras foram transferidos e mantidos por 30 minutos numa câmara, contendo solução de pCa 8.5 com EGTA 5,0mM, na qual adicionou-se 30 µg/ml de saponina.

Em 1980, Podolsky demonstrou que com o uso da saponina o sarcolema pode ter suas moléculas de colesterol solubilizadas, e com isso, causar perfurações nesta estrutura. Também a membrana do sistema tubular transversal será seletivamente perfurada. Outros sistemas de membranas presentes nas fibras não sofrem ação da saponina porque são destituídos de colesterol (MEISSNER e FLEISCHER, 1971). Com a utilização desta técnica o Rs bem como o sistema contrátil ficam com o acesso liberado para a ação dos constituintes das soluções utilizadas nos experimentos. Isto permite que se

estude 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 forneceu dados da quantidade de cálcio liberada pelos Rs (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 retirada uma fibra muscular e suas extremidades foram fixadas a um transdutor de força (Scientific Instruments G.M.B.H., Heidelberg, República Federal da Alemanha). Uma extremidade foi mantida em posição estacionária e a outra em um braço móvel. O registro de força de contração foi realizado num polígrafo (Gold Corporation, Cleveland, modelo 2108 XX). Um conjunto de câmaras, com capacidade para 2,5ml (cada câmara), construídos em um bloco de acrílico móvel permitiram que a fibra fosse submetida a diferentes protocolos experimentais (NOSEK *et al.* 1990; ZHU e NOSEK, 1992; GODT *et al.* 1993a). As soluções foram constantemente agitadas mediante barras metálicas magnetizadas por um agitador.

As fibras desmembranadas foram submetidas a diferentes soluções experimentais de acordo com o protocolo desejado. Cada fibra pode ser empregada como seu próprio controle.

2.3.1 Protocolo Experimental

Com o objetivo de se avaliar a capacidade do retículo sarcoplasmático em captar, armazenar e liberar íons cálcio e o papel do anetol e do perclorato neste mecanismo foi desenvolvido um protocolo controle. Este protocolo consistiu primeiramente na passagem da célula desmembrada por saponina com solução contendo pCa 8.5 e concentração de EGTA de 5,0mM (tabela 2) por 30 segundos, esta solução permitiu que a fibra ficasse em repouso. Após o tempo citado a fibra foi transferida para a solução contendo pCa 6.4, que é responsável por carregar o Rs com íons cálcio. Nesta solução a fibra foi mantida por 2 minutos (NOSEK *et al.* 1997). Na seqüência a fibra muscular foi transferida para solução de pCa 8.5 com EGTA é de 5,0mM. Esta solução reduz a capacidade de

tamponamento de íons cálcio no interior das miofibrilas, o qual foi posteriormente liberado do Rs. Para tal, a preparação foi transferida para a solução de pCa 8.5 e EGTA 0,5mM na qual adicionou-se 30mM 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 Rs ativasse o sistema contrátil. A contração muscular assim obtida forneceu um índice apropriado de 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 solução contendo pCa 8.5 com EGTA 5,0mM para a solução contendo pCa 4.0 (tabela 2) que é responsável por induzir a força máxima de contração. Após a obtenção do platô de força, o relaxamento da fibra foi obtido quando de sua transferência para a solução de pCa 8.5 e EGTA com 5,0mM. Esse protocolo controle foi realizado no início e no final de cada experimento.

A avaliação do efeito do anetol nos mecanismos de liberação de íons cálcio do Rs foi realizada inicialmente através da passagem da fibra muscular pelas soluções do protocolo controle acima descrito. Após o protocolo controle, estando a fibra na solução com pCa 8.5 e EGTA 5,0mM, ela foi transferida para a solução contendo pCa 6.4, para que o Rs fosse carregado novamente, ali permanecendo por dois minutos. Na seqüência, a célula foi mergulhada na solução de pCa 8.5 com 0,5mM de EGTA e, posteriormente, transferida para a solução de pCa 8.5 e EGTA com 0,5mM na presença de anetol (1mM). Após a repetição do protocolo descrito acima, a fibra foi mergulhada em solução contendo pCa 8.5 e 0,5mM de EGTA associada à cafeína 1mM. Novamente a fibra foi submetida ao protocolo acima, sendo então mergulhada em câmara contendo solução com pCa 8.5 e 0,5mM de EGTA associado ao perclorato 10mM. A fibra muscular passa novamente pela seqüência de carregamento, sendo então, submetida à solução contendo pCa 8.5 e EGTA com 5,0mM associada ao anetol (1mM) e à cafeína (1mM). Repetindo o protocolo de carregamento da fibra, esta é mergulhada em câmara contendo solução com pCa 8.5 e 0,5mM de EGTA, anetol 1mM e perclorato 10mM.

2.4 Preparação de Fibra Desmembranada com Uso de Triton X-100

As fibras 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 solução com pCa 8.5 e 5,0mM de EGTA 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 adicionadas 0,1mM de fluoreto de fenilmetil sulfonil (PMSF) e 1mM 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).

Após a realização da curva força / concentração de cálcio controle (na ausência de droga) foi adicionado anetol (5mM) à seqüência crescente de íons cálcio, o mesmo foi realizado adicionando-se perclorato (9mM). No final de cada experimento a curva controle foi repetida. Estes experimentos foram realizados para verificar se drogas como o anetol 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 normalizadas 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 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 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 100mM de 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 ClO_4^- foram preparadas através da substituição isotônica da NaCl por $NaClO_4$. Soluções contendo anetol 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^{+2}	ClO_4^-
Na ⁺	110	74	34	14	14	110
K ⁺	4	40	80	100	100	4
Mg ⁺²	2	2	2	2	2	2
Ca ⁺²	2	2	2	2	-	2
Cl ⁻	122	122	122	122	122	122
TRIS	10	10	10	10	10	10
EGTA	-	-	-	-	1	-
ClO_4^-	-	-	-	-	-	0,1-150
TOTAL	250	250	250	250	250	250

Temperatura: 22°C; pH: 7,4

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

Tabela 2: Composição das soluções (em mM), calculadas através do programa MS and BES (turbo 87 ver 3,0), utilizadas para protocolos experimentais realizados com fibra permeabilizada com saponina ou Triton X-100

COMPONENTES	PCa 8.5	pCa 6.4	pCa 8.5	pCa 4.0
EGTA	5.0	5.0	0.5	5.0
MgATP	1.0	1.0	1.0	1.0
CP	15.0	15.0	15.0	15.0
Mg ²⁺	1.0	1.0	1.0	1.0
BES	50.0	50.0	50.0	50.0
pCa	8.5	6.4	8.5	4.0
Força iônica	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 mM), 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.

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 utilizados neste trabalho, foram obtidos da Sigma Chemical Co. (EGTA, Flureto de fenilmetilsulfonil, benzamidina, fosofocreatina, ATP, glicerol, MgCl_2 , BES, CaCl_2 , anetol, Triton X-100 e cafeína), Merck (ácido metanossulfônico) e Reagen (KOH, KCl).

3 RESULTADOS

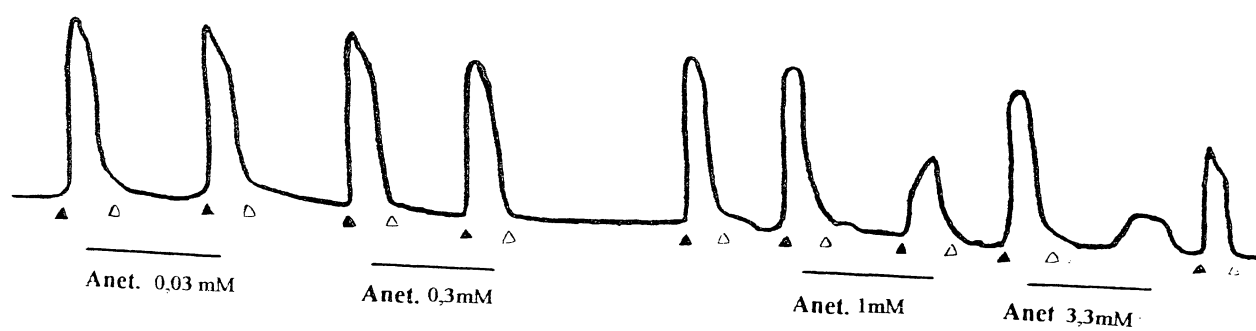
3.1 Avaliação dos Efeitos do Anetol (0,03; 0,3; 1; 3,3 mM) em Contratura Induzida por 100 mM de K⁺ em Músculo Sartório Isolado de Rã

Os resultados da medida de encurtamento muscular, realizados com músculo intacto em soluções contendo anetol (0,03; 0,3; 1; 3,3 mM), em contratura induzida por 100 mM de K⁺ estão mostrados na figura 8. Nessa figura os níveis de encurtamento muscular estão normalizados para os valores obtidos em contratura potássica (100 mM). O encurtamento muscular em soluções contendo 0,03; 0,3; 1; 3,3 mM de anetol foram respectivamente $95,83 \pm 6,99 \%$; $79,22 \pm 14,13 \%$; $65,77 \pm 8,52 \%$; $12,62 \pm 6,54 \%$ em relação ao controle.

3.2 Efeitos do Anetol (1 mM) em Contratura Induzida por Cafeína (1 mM) em Músculo Sartório Isolado de Rã

O efeito do anetol (1 mM) na contratura induzida por cafeína (1 mM) está representada na figura 9. A contratura induzida por Ringer 100 mM de potássio na presença de anetol 1 mM correspondeu a $74,18 \pm 11,65 \%$ da contração induzida por 100 mM de potássio. A cafeína (1 mM) em solução de 4 mM de potássio não gerou contração. A incubação do músculo em 4 mM de potássio e cafeína 1 mM também não resultou em contração. Solução com 4 mM de potássio, cafeína 1 mM e anetol 1 mM promoveu contração de $4,6 \pm 2,96 \%$ da contratura por 100 mM de potássio.

a:



b:

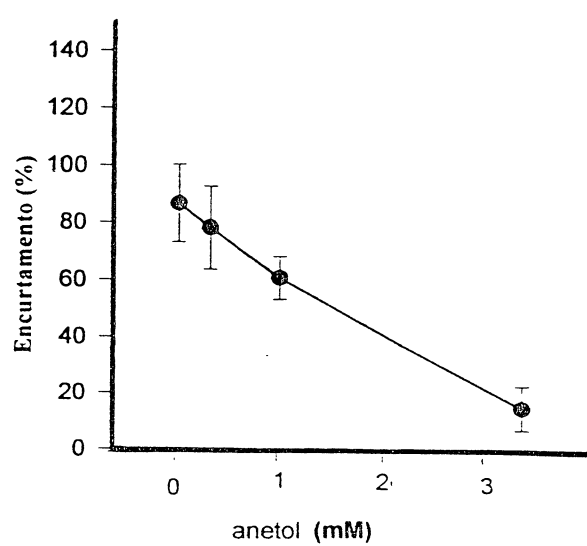


Fig. 8 – Efeito do anetol em contratura induzida por 100 mM de K⁺

A figura 8 demonstra o efeito em contratura induzida por 100 mM de K⁺ em músculo sartório isolado de rã. Em “a”, registro original de um experimento típico (n=6), mostra no controle a contratura induzida por 100 mM de anetol. A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta ao anetol. Os símbolos fechado (▲) e aberto (Δ) indicam o momento em que a preparação foi exposta à solução contendo alta concentração de K⁺ (100 mM) e o momento em que foi exposta a solução de Ringer normal (4mM) K⁺), respectivamente. Em “b”, o símbolo (●) representa os valores de encurtamento, obtidos na presença de anetol, durante a exposição da preparação a uma solução contendo 100 mM de K⁺. Os valores experimentais do encurtamento foram normalizados para os obtidos nas condições controle (contratura com 100 mM de K⁺). Os valores estão representados como a média $\pm$ erro padrão.

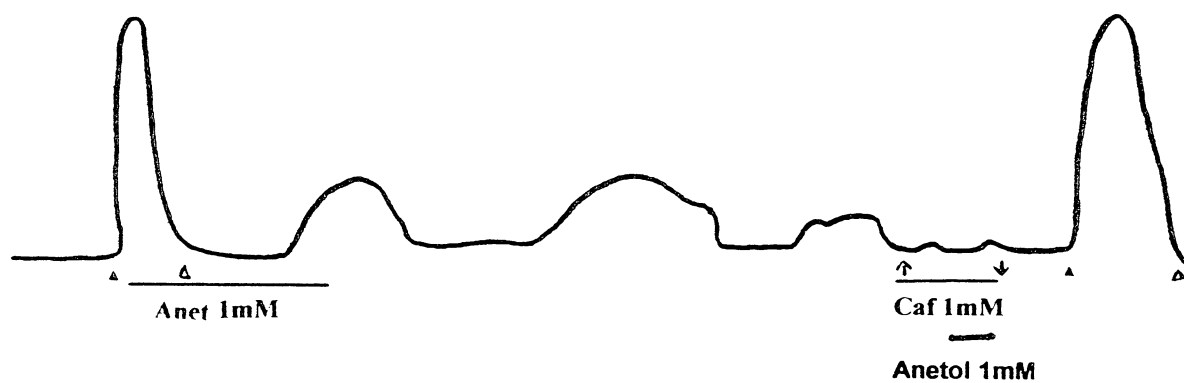
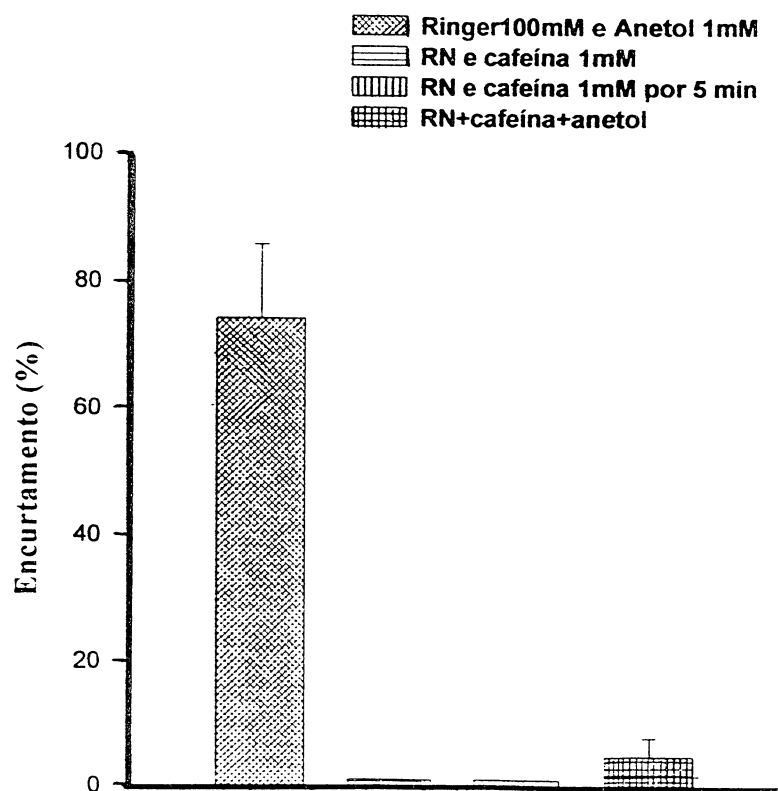
a**b**

Fig. 9 – Efeito do anetol (1 mM) em contratura induzida por cafeína (1 mM)

A fig.9 mostra o efeito do anetol (1 mM) em contratura induzida por cafeína (1 mM) em músculo sartório isolado de rã. Em “a”, registro original de um experimento típico, em que a primeira e a última contraturas foram obtidas com 100 mM de K⁺. Após a contração inicial o músculo foi incubado em Ringer normal (4mM K⁺) e anetol (1 mM) por 15'. A contratura seguinte indica a adição de Ringer 100 mM K⁺ e anetol (1 mM). Antes da contratura final com Ringer (100 mM K⁺) foi adicionada solução de cafeína (1 mM). Os símbolos (↑) e (↓), 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 foi exposta à solução 1 mM de anetol. Os símbolos fechado (▲) e aberto (Δ) indicam o momento em que a preparação foi exposta à solução de Ringer normal (4 mM K⁺) e Ringer (100 mM K⁺), respectivamente. Em “b”, gráfico representando, nas colunas os valores percentuais das contraturas induzidas por Ringer (100 mM K⁺) e anetol (100 mM); Ringer (4 mM K⁺) + cafeína (1 mM) + anetol (1 mM), 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⁺.

3.3 Efeito do Anetol (1 mM) em Contratura Induzida por Cafeína (3 mM) em Músculo Sartório Isolado de Rã

Na figura 10, obteve-se uma contratura de $48,6 \pm 3,5$ % da contratura em 100 mM de K⁺, em solução de Ringer normal e cafeína (3 mM). Anetol 1 mM não promoveu contração por si só em Ringer normal. A associação de cafeína 3 mM e anetol 1 mM em Ringer normal, produziu uma contração de $217,88 \pm 46,22$ % da contratura induzida por 100 mM de potássio.

3.4 Efeito do Anetol (1; 3 ou 6 mM) nas Contraturas Induzidas por Potássio (4; 40; 80 Ou 100 mM) em Músculo Sartório Isolado de Rã

Os efeitos do anetol (1; 3 ou 6 mM) nas contraturas induzidas por potássio (4; 40; 80 ou 100 mM), em músculo sartório isolado de rã, estão representados nas figuras 11, 12 e 13, respectivamente. Os resultados obtidos com as contraturas induzidas por potássio (4; 40; 80 ou 100 mM) na presença de 1 mM de anetol, representados na figura 11, mostram que não houve diferença significativa entre as contraturas induzidas por K^+ (4; 40; 80 ou 100 mM) na ausência e na presença de 1 mM de anetol.

Na figura 12, estão demonstrados os resultados obtidos com as contraturas induzidas por potássio (4; 40; 80 ou 100 mM), na presença de 3 mM de anetol. Com a alteração da concentração do anetol (1 mM para 3 mM), os valores das contraturas induzidas por K^+ (4; 40; 80 ou 100 mM) são também alterados, ocorrendo uma inibição da mesma.

Na figura 13, o gráfico demonstra os resultados obtidos com as contraturas induzidas por potássio (4; 40; 80 ou 100 mM). Na presença de anetol (6 mM) observa-se que o anetol na concentração de 6 mM inibe a contração.

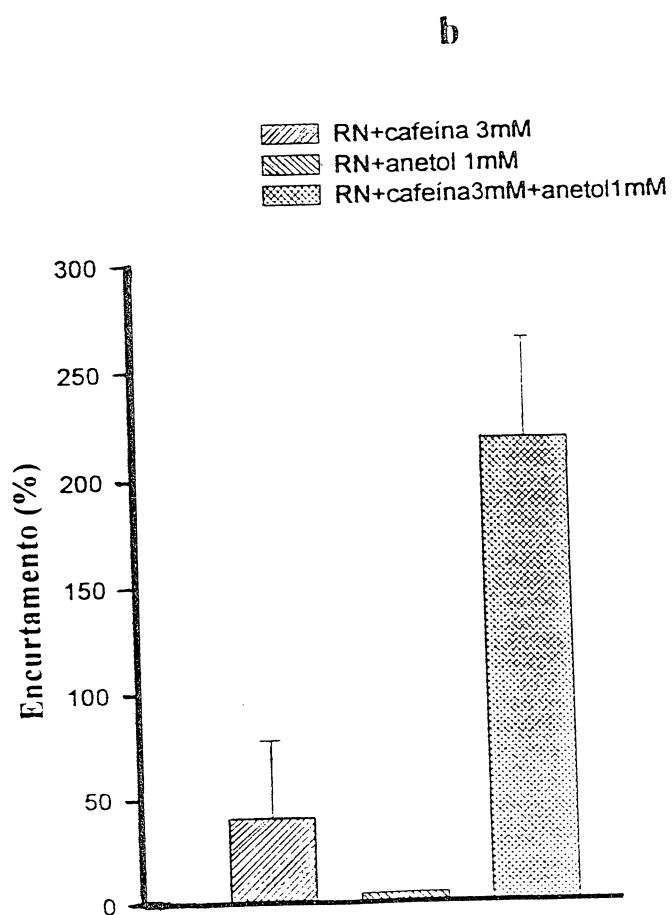
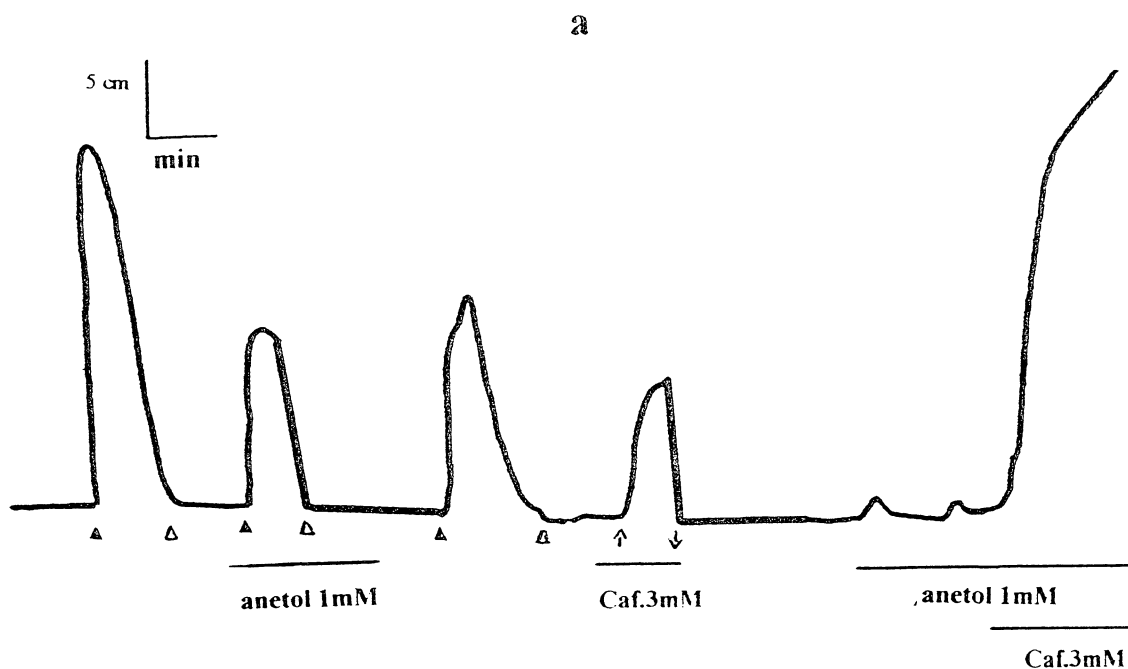
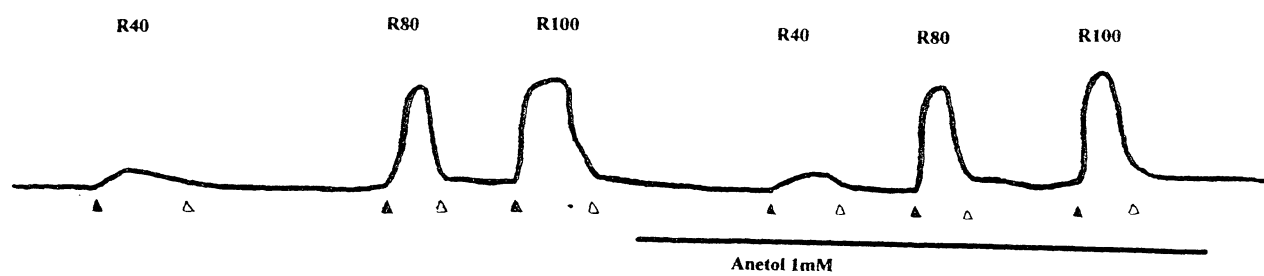


Figura 10 – Efeito do anetol (1 mM) em contratura induzida por cafeína (3 mM)

A figura 10 representa o efeito do anetol (1 mM) em contratura induzida por cafeína (3 mM) em músculo sartório isolado de rã. Em “a”: registro original de um experimento típico. A primeira contratura foi obtida com 100 mM K⁺. A segunda e a terceira contraturas foram obtidas com Ringer (100 mM k⁺) e anetol contendo anetol (1 mM) por 15 minutos. Foi então adicionada cafeína (3 mM) e depois anetol (1 mM) e cafeína (3 mM). Os símbolos (↑) e (↓), 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 foi exposta à solução 1 mM de anetol. Os símbolos fechado (▲) e aberto (Δ) indicam o momento em que a preparação foi exposta à solução contendo alta concentração de K⁺ (100 mM) e no momento em que ela foi exposta à solução de Ringer normal (4 mM K⁺), respectivamente. Calibração: a barra vertical indica o encurtamento (em cm) e a horizontal, o tempo (em minuto). Em “b”: gráfico representando na primeira, segunda e terceiras colunas, os valores percentuais da contratura induzida por cafeína e anetol respectivamente. Os dados de encurtamento, expressos na ordenada representam a média $\pm$ o erro padrão e foram normalizados para os obtidos em 100 mM K⁺.

a:



b:

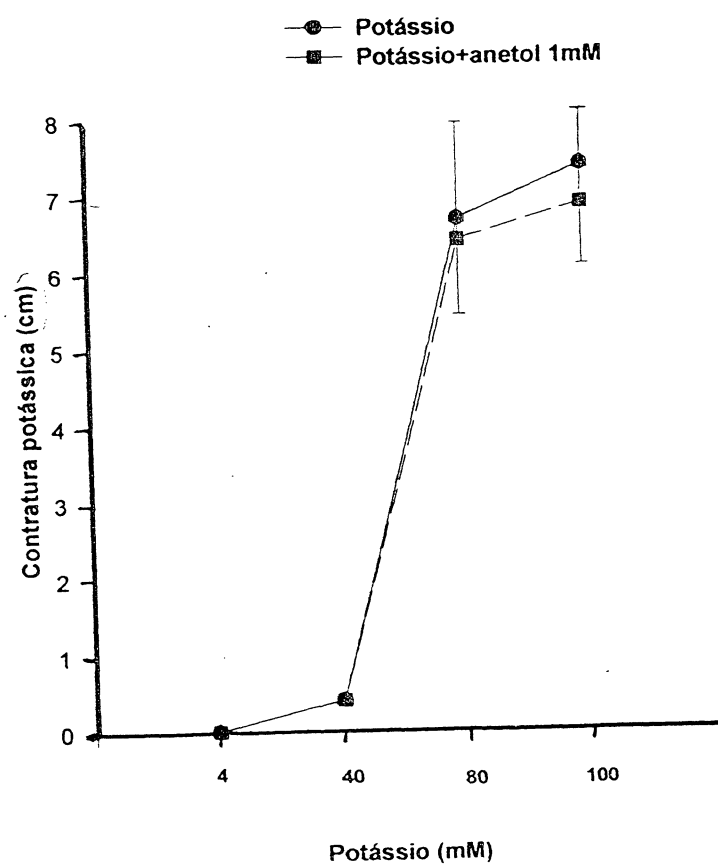


Fig. 11 – Efeito do anetol (1 mM)

A Fig. 11 apresenta o efeito do anetol (1 mM) nas contraturas induzidas por potássio (4; 40; 80 e 100 mM) em músculo sartório isolado de rã. Em “a”: registro original de um experimento típico, em que se verificam na seqüência, as contraturas induzidas por potássio (4; 40; 80 e 100 mM) sem a presença de anetol (1 mM) e após um relaxamento com Ringer (4 mM K⁺), a seqüência foi repetida, agora adicionando-se anetol (1 mM). A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta ao anetol (1 mM). Os símbolos fechado (▲) e aberto (Δ) indicam os momentos em que a preparação foi exposta à solução contendo alta concentração de K⁺ (40, 80 ou 100 mM) e o momento em que a mesma foi exposta à solução de Ringer normal (4 mM K⁺) respectivamente. Calibração: a barra vertical indica encurtamento (em cm) e a horizontal, o tempo (em minutos). Em “b”: representação gráfica dos valores de contratura potássica quando em contato com diferentes concentrações de potássio. Os símbolos (●) (■) indicam os valores na presença e ausência do anetol (1 mM) respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ o erro padrão.

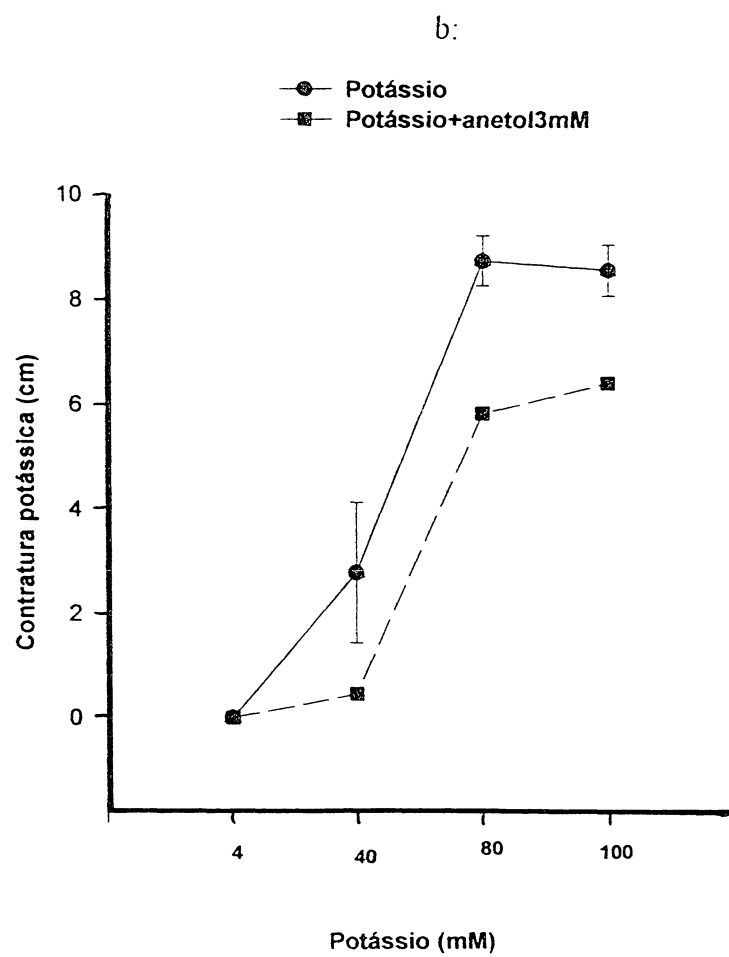
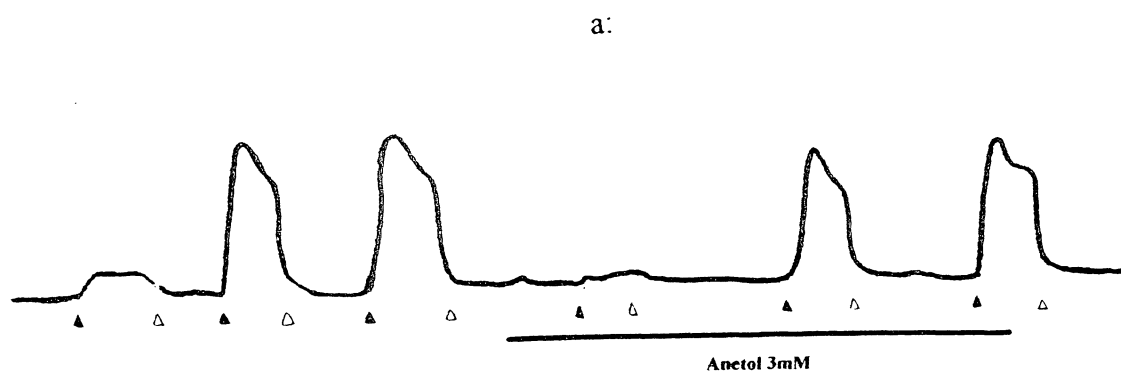
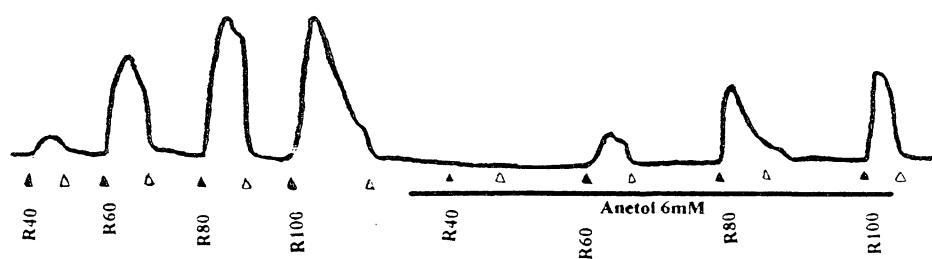


Fig. 12 – Efeito do anetol (3 mM)

A fig. 12 representa o efeito do anetol (3 mM) nas contraturas induzidas por potássio (4; 40; 80 e 100 mM) em músculo sartório isolado de rã. Em “a”: registro original de um experimento típico, em que se verificam na seqüência, as contraturas induzidas por potássio (4; 40; 80 e 100 mM) sem a presença de anetol (3 mM) e após um relaxamento com Ringer (4 mM K⁺), a seqüência foi repetida, agora adicionando-se anetol (3 mM) com n=6. A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta ao anetol (3 mM). Os símbolos fechado (▲) e aberto (Δ) indicam os momentos em que a preparação foi exposta à solução contendo alta concentração de K⁺ (40, 80 ou 100 mM) e o momento em que a mesma foi exposta à solução de Ringer normal (4 mM K⁺) respectivamente. Calibração: a barra vertical indica encurtamento (em cm) e a horizontal, o tempo (em minutos). Em “b”: representação gráfica dos valores de contratura potássica em percentagem quando em contato com diferentes concentrações de potássio. Os símbolos (●) (■) indicam os valores na presença e ausência do anetol (3 mM) respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ o erro padrão.

a:



b:

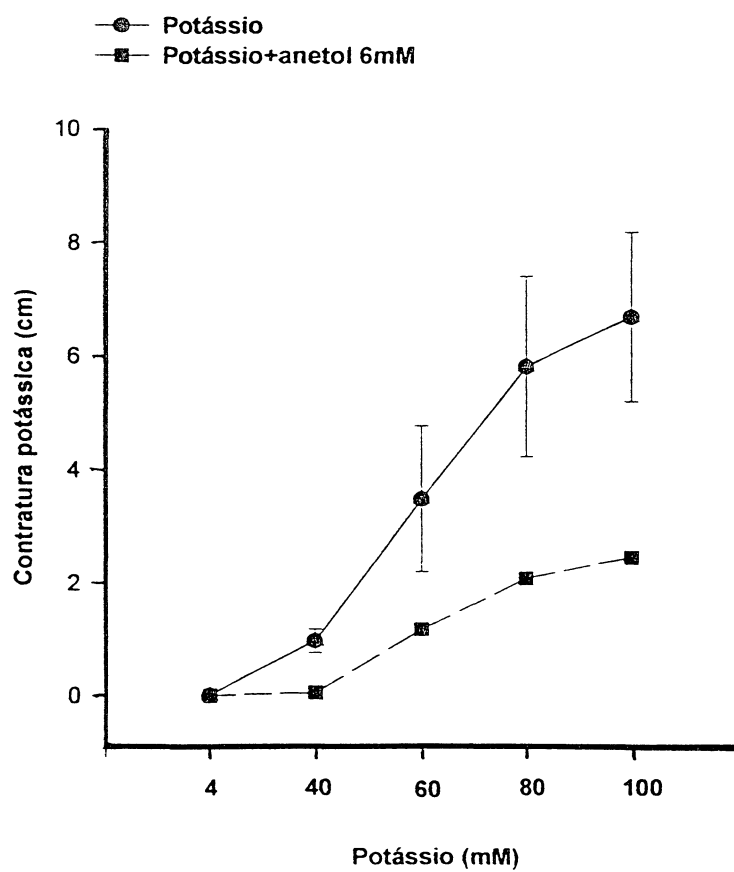
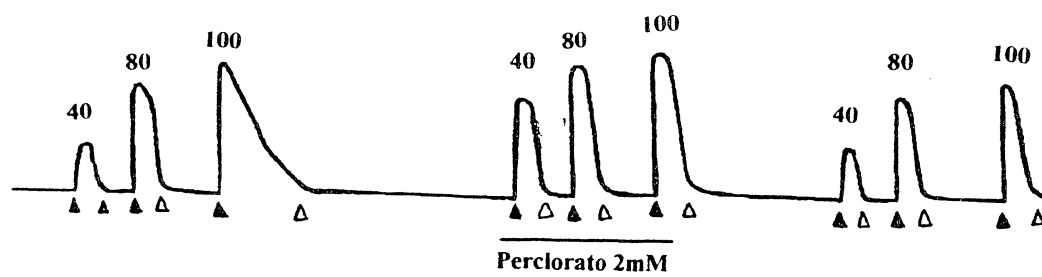


Fig. 13 – Efeito do anetol (6 mM)

A fig. 13 apresenta o efeito do anetol (6 mM) nas contraturas induzidas por potássio (4; 40; 80 e 100 mM) em músculo sartório isolado de rã, com n=6. Em “a”: registro original de um experimento típico, em que se verificam na seqüência, as contraturas induzidas por potássio (4; 40; 80 e 100 mM) sem a presença de anetol (6 mM) e após um relaxamento com Ringer (4 mM K⁺), a seqüência foi repetida, agora adicionando-se anetol (6 mM). A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta ao anetol (6 mM). Os símbolos fechado (▲) e aberto (Δ) indicam os momentos em que a preparação foi exposta à solução contendo alta concentração de K⁺ (40, 80 ou 100 mM) e o momento em que a mesma foi exposta à solução de Ringer normal (4 mM K⁺) respectivamente. Calibração: a barra vertical indica encurtamento (em cm) e a horizontal, o tempo (em minutos). Em “b”: representação gráfica dos valores de contratura potássica em percentagem quando em contato com diferentes concentrações de potássio. Os símbolos (●) (■) indicam os valores na presença e ausência do anetol (6 mM) respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ o erro padrão.

a:



b:

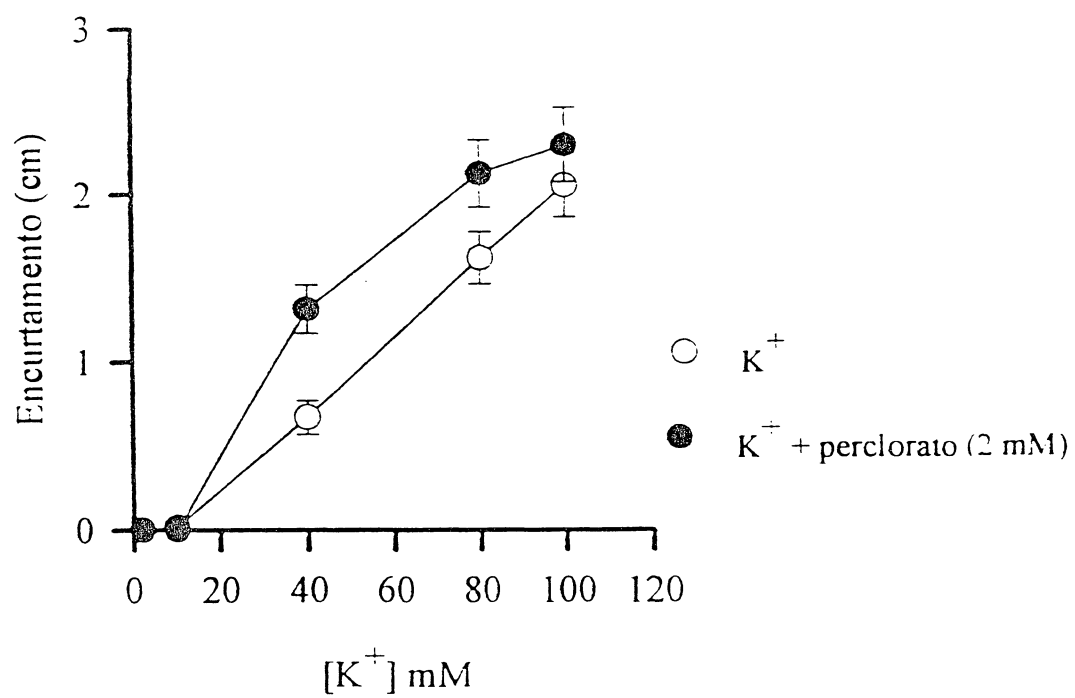


Fig. 14 – Efeito do perclorato (2 mM)

A fig. 14 apresenta o efeito do perclorato (2 mM) nas contraturas induzidas por potássio (4; 40; 80 e 100 mM) em músculo sartório isolado de rã com $n=6$. Em "a": registro original de um experimento típico, em que se verificam na seqüência, as contraturas induzidas por 4; 40; 80 e 100 mM de K^+ . As três primeiras e as três últimas contraturas intermediárias na apresentação de ânion. A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta ao perclorato. Os símbolos fechado ($\blacktriangle$) e aberto ($\triangle$) indicam os momentos em que a preparação foi exposta à solução contendo alta concentração de K^+ (40, 80 ou 100 mM) e o momento em que a mesma foi exposta à solução de Ringer normal (4 mM K^+) respectivamente. Calibração: a barra vertical indica encurtamento (em cm) e a horizontal, o tempo (em minutos). Em "b": representação gráfica dos valores de encurtamento muscular obtidos e soluções contendo 40, 80 ou 100 mM de K^+ . O símbolo ($\circ$) e fechado ($\bullet$) indicam os valores de encurtamento muscular obtidos na presença e ausência de perclorato respectivamente. Os valores de encurtamento muscular (em cm) estão representados na ordenada, e da concentração extracelular de K^+ na abcissa. Os valores estão expressos como a média $\pm$ o erro padrão.

3.5 Efeito do Perclorato (2 mM) nas Contraturas Induzidas por K^+ (40, 80 ou 100 mM) em Músculo Sartório Isolado de Rã

Os efeitos de 2 mM de perclorato nas contraturas induzidas por 40, 80 ou 100 mM de K^+ estão demonstrados na figura 14 no painel "a". Como pode ser verificado, a adição de 2 mM de perclorato nas soluções contendo 40, 80 e 100 mM de K^+ , produziu um efeito potencializante das contraturas induzidas pela elevação na concentração de K^+ . Os dados obtidos em contraturas induzidas por 40, 80 e 100 mM de K^+ na ausência de perclorato foram de 0 ± 0 ; $0,1 \pm 0,05$ %; $1,5 \pm 0,67$ %; $1,4 \pm 0,65$ %; $2,1 \pm 0,95$ %, respectivamente. Na presença do ânion perclorato nas concentrações de K^+ acima descritas os valores obtidos foram de 0 ± 0 ; 0 ± 0 ; $7,2 \pm 0,8$ %; $11,68 \pm 1,12$ %; $12,63 \pm 1,2$ %, respectivamente. Esses dados estão representados graficamente no painel "b" da figura 14. 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 do encurtamento muscular para uma dada concentração extracelular de K^+ para esquerda.

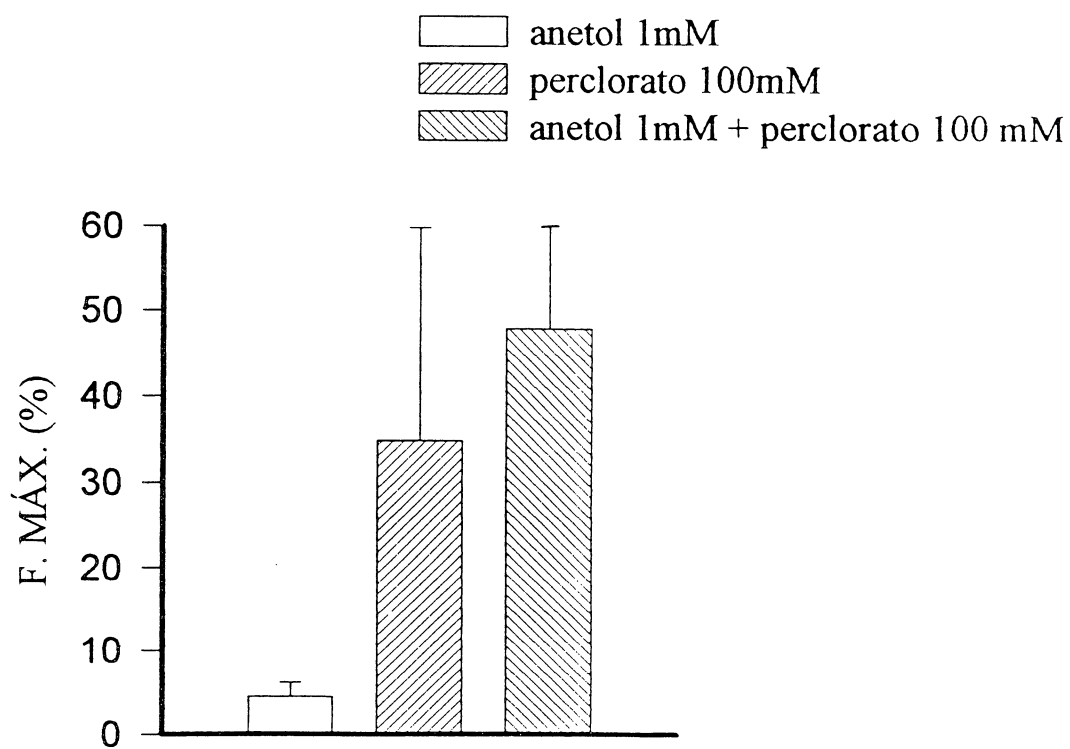
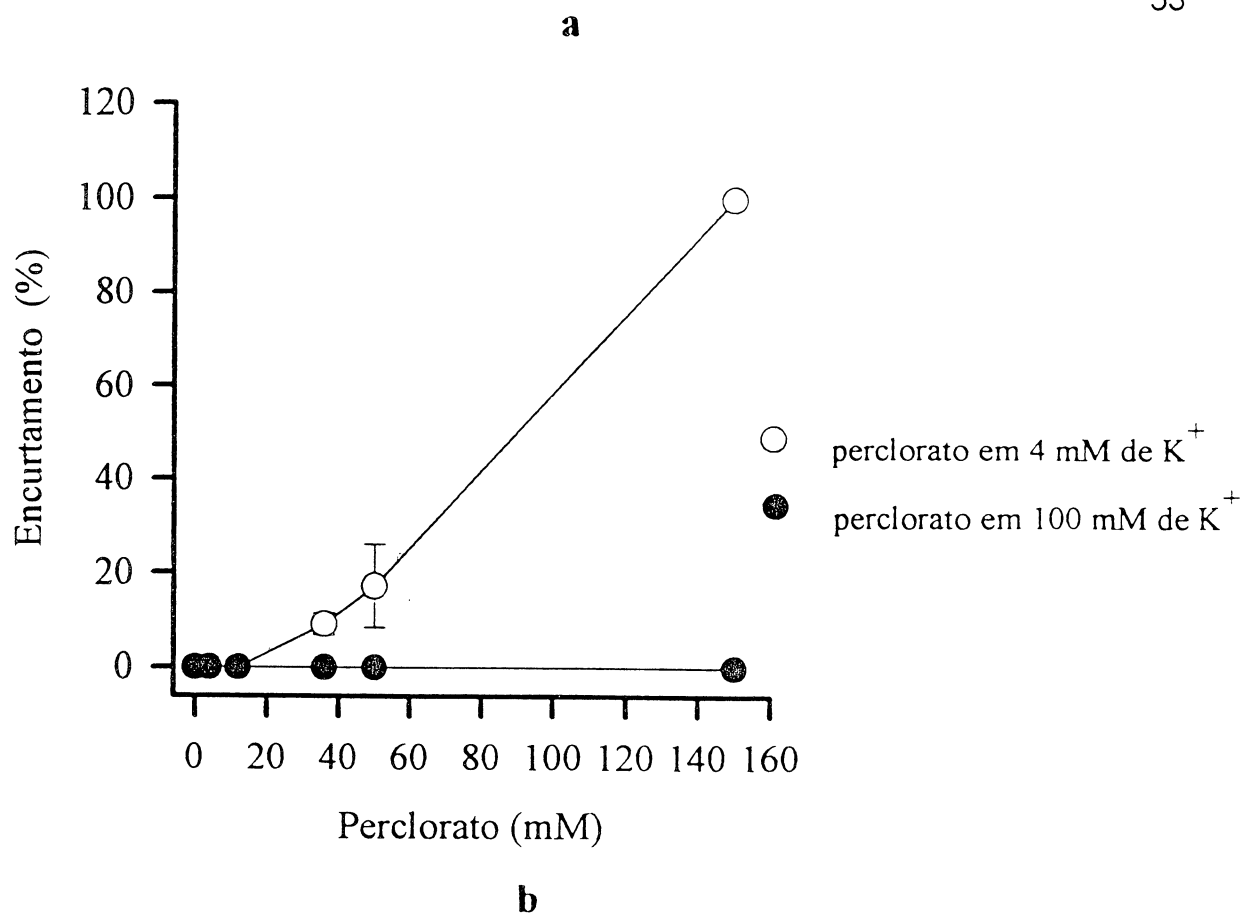


Fig. 15 – Curva dose-resposta ao perclorato (0,1 à 150 mM)

A fig. 15 apresenta o efeito de contrações crescentes de perclorato (0,1 à 150 mM) em músculo sartório isolado de rã, mantidos em solução contendo 4 ou 100 mM de K^+ , com $n=6$. A figura *a* representa os diferentes níveis de encurtamento desenvolvidos em preparações submetidas à soluções contendo concentrações crescentes, de perclorato (0,1 à 150 mM) em 4 mM K^+ (símbolo aberto) e em 100 mM de K^+ (símbolo fechado). Na figura *b* 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.

3.6 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 15a. 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 15b. Como pode ser verificado o efeito de contração do perclorato só se manifesta quando a concentração externa 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^+ . Na figura 16b podemos observar o efeito do perclorato (100 mM) em anetol (1 mM).

3.7 Efeito do Anetol (1 mM) na Contratura Induzida por Concentrações Crescentes de Perclorato (1; 3; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60 mM) em Preparações de Músculo Sartório Isolado de Rã Mantidos em Ringer Normal

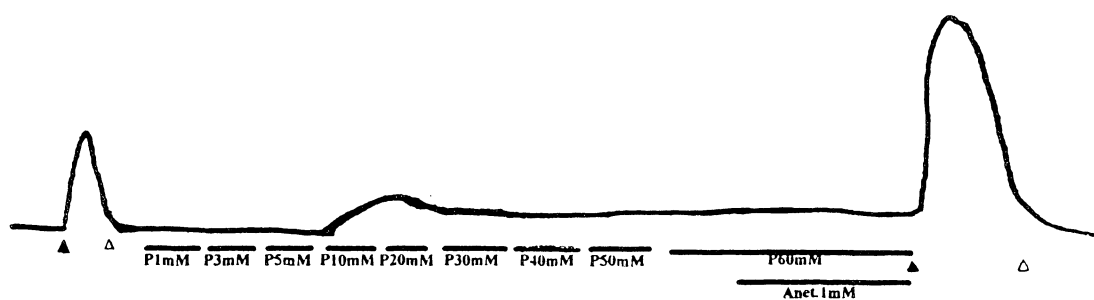
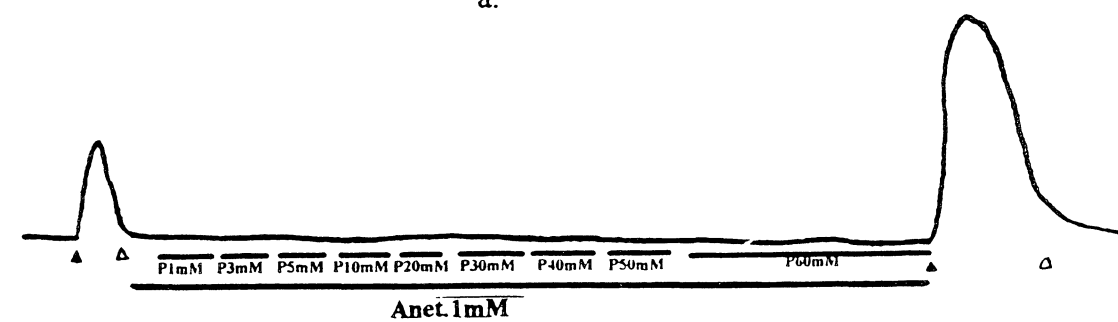
Na figura 16 pôde-se observar o efeito de concentrações crescentes de perclorato (1; 3; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60 mM). O perclorato, em concentrações crescentes, na presença do Ringer normal (4 mM de K^+) é capaz de induzir

contração. Quando o anetol (1 mM) é adicionado no início do experimento, inibe o efeito do perclorato, não permitindo que ocorra contração do músculo.

3.8 Efeito do Anetol (1 mM) na Contratura Induzida por Concentrações Crescentes de Perclorato em Preparações de Músculo Sartório Isolado de Rã Mantidos em Ringer 100 mM de K^+

O efeito de concentrações crescentes de perclorato em solução contendo 100 mM de K^+ está representado na figura 17. Fica evidente que a indução à contração não ocorre em presença de Ringer com 100 mM de potássio. Mesmo adicionando perclorato a solução, não se observa atividade contrátil significativa, ficando evidente que a contração só ocorre quando o potencial de membrana das células musculares é mantido num nível muito baixo (próximo ao potencial de repouso). Quando ocorre adição de anetol (1 mM) não se observa efeito potencializador significativo na contração do músculo.

a:



b:

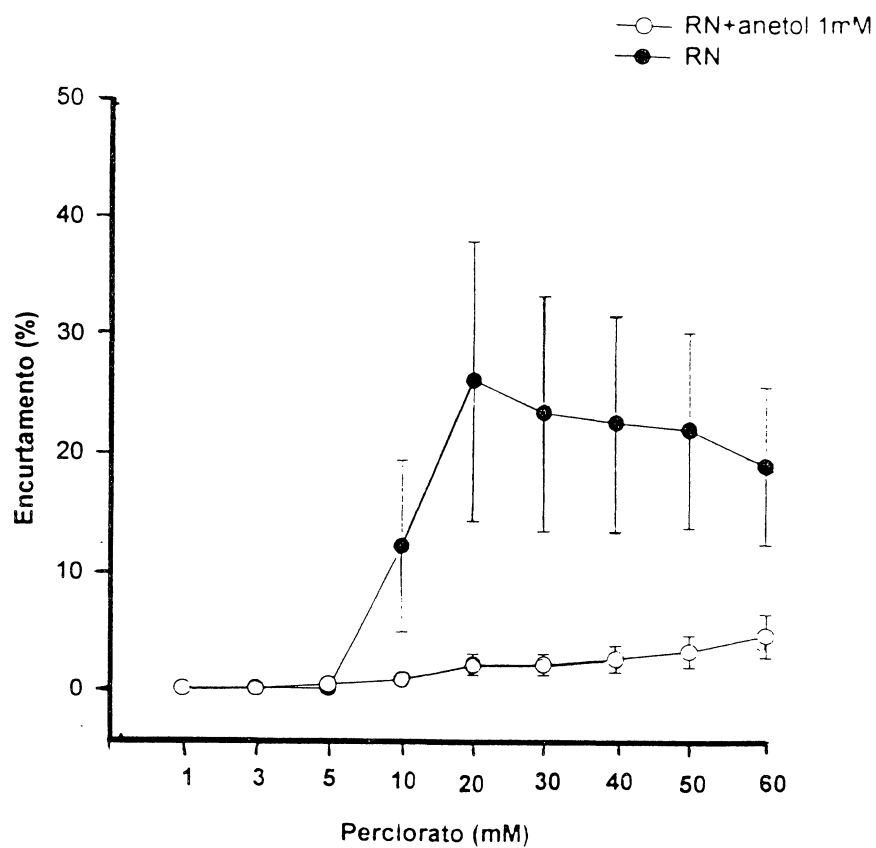


Fig. 16 – Efeito do anetol (1 mM) em Ringer normal

A fig. 16 apresenta o efeito do anetol (1 mM) na contratura induzida por concentrações crescentes de perclorato em preparações de músculo sartório isolado de rã mantidos em Ringer normal. Em “a”: após uma contratura induzida por 100 mM K⁺, adicionou-se a solução de Ringer normal (4 mM K⁺) o ânion perclorato até obter-se a concentração desejada (1 a 60 mM) na ausência e na presença de anetol (1 mM). As barras horizontais representam o tempo de exposição da preparação ao perclorato e ao anetol. Os símbolos fechado (▲) e aberto (Δ) representam respectivamente o momento em que a preparação foi submetida a 100 mM de K⁺ ou 4 mM de K⁺, respectivamente. Calibração: a barra vertical indica encurtamento (em cm) e a horizontal indica o tempo (em min.). Em “b”: representação gráfica do efeito da interação do íon perclorato (1 a 60 mM) e anetol (1 mM) em preparações mantidas em solução contendo 4 mM de K⁺. Nesta figura os símbolos aberto (○) e fechado (●) representam respectivamente a curva dose / resposta ao perclorato e aos valores dos encurtamentos obtidos em preparações submetidas às soluções contendo concentrações crescentes de perclorato e anetol (1 mM). A ordenada representa os valores de encurtamento (em percentagem) e a abcissa representa as concentrações de perclorato.

3.9 Efeito da Interação Da Cafeína (1 mM) e do Íon Perclorato (10 mM) com o Anetol (1 mM) em Contraturas de Fibras de Rã Permeabilizadas com Saponina

Na figura 18, estão demonstrados os efeitos da capacidade do retículo sarcoplasmático em captar, armazenar e liberar íons e o papel do anetol e do perclorato nestes mecanismos. Após o tratamento descrito em materiais e métodos (vide Protocolo Experimental) a fibra foi submetida ao anetol (1 mM) ou a cafeína (1 mM) ou ao perclorato (10 mM). Os dados obtidos evidenciam que estas substâncias, nestas concentrações, não são capazes de induzir a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Após a realização da 1ª fase do experimento (vide Materiais e Métodos) foram utilizadas combinações entre anetol (1 mM) a

cafeína (1 mM) e anetol (1 mM) e perclorato (10 mM), demonstrando que com a ação do anetol (1 mM), ocorreu a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, em relação ao experimento controle (30 mM cafeína) os valores foram $78,61 \pm 26,83 \%$ e $58,41 \pm 21,66 \%$ respectivamente.

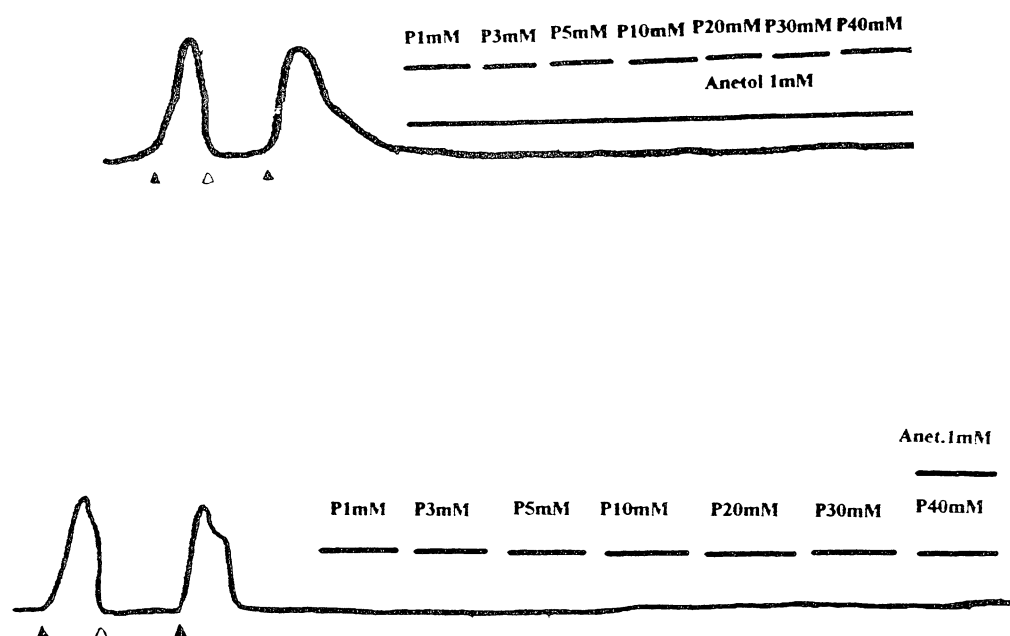
3.10 Efeito do Anetol (5 mM) na Relação Força / $[Ca^{2+}]$ em Fibra Permeabilizada com Triton X - 100

Com o objetivo de se verificar se o anetol influencia a relação força / $[Ca^{2+}]$ em fibra permeabilizada com Triton X - 100, realizou-se um experimento com concentrações crescentes de íon cálcio na ausência de anetol 5 mM e na presença de anetol 5 mM. A solução contendo concentrações crescentes de íons cálcio associada ao anetol 5 mM não produziu alteração na sensibilidade do sistema contrátil. Os valores de força máxima obtidos na presença de 5 mM de anetol foram $100,50 \pm 2,50 \%$ dos valores obtidos na ausência deste composto. Os resultados podem ser observados na figura 19.

3.11 Efeito da Procaína (10 mM) sobre Contraturas Induzidas pelo Anetol (1 mM) e Perclorato (10 mM) em Fibra Permeabilizada com Saponina

A procaína é um potente bloqueador de canais de cálcio do RS (Martin *et al*, 1993; Shoshan - Barmatz e Zchut, 1993; Xu *et al*, 1993). Por este motivo este composto foi utilizado para verificar se o efeito do anetol seria decorrente da liberação de cálcio do RS. No protocolo, após terem sido testados os efeitos do anetol (1 mM) e perclorato (10 mM) isoladamente e em associação, a fibra foi incubada durante 10' com procaína 10 mM. Após este período o RS da fibra foi submetido a novo carregamento de cálcio com solução de pCa 6.4 e a fibra foi exposta a solução contendo anetol (1 mM) associado a perclorato (10 mM) e procaína (10 mM). Os resultados podem ser observados na figura 20.

a:



b:

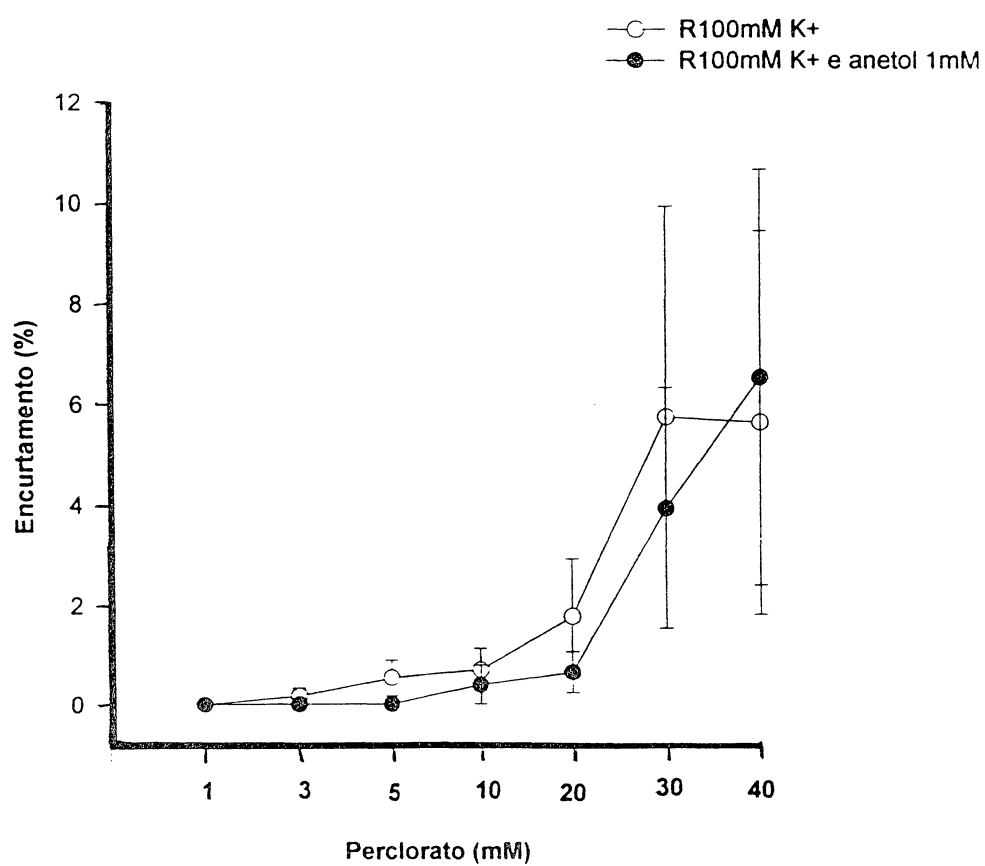
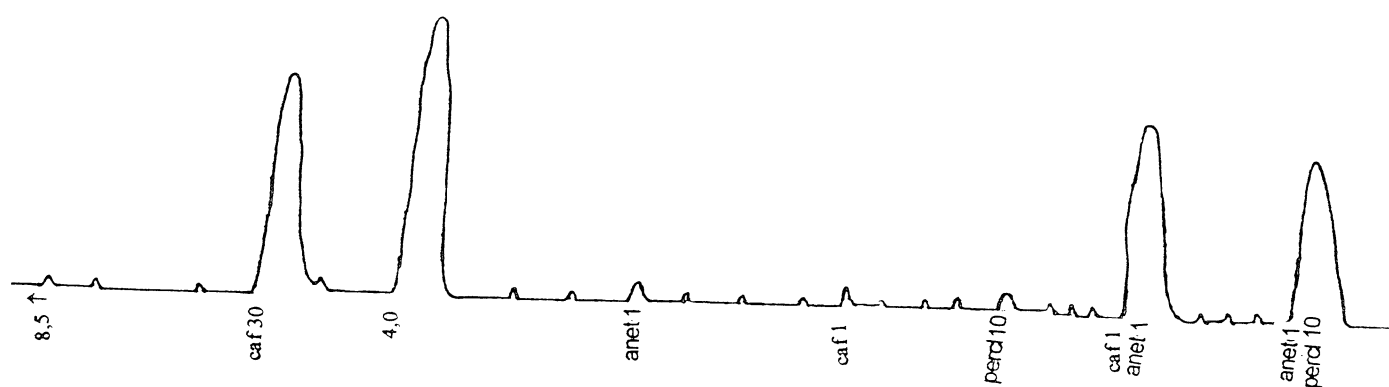


Fig. 17 – Efeito do anetol (1 mM) na contratura induzida por contrações crescentes de perclorato

A fig. 17 apresenta o efeito do anetol (1 mM) na contratura por concentrações crescentes de de músculo sartório isolado de rã mantidos em Ringer 100 mM K⁺. Em “a”: após uma contratura induzida por 100 mM K⁺, adicionou-se a solução de Ringer (100 mM K⁺) o ânion perclorato até obter-se a concentração desejada (1 a 40 mM) na ausência de anetol (1 mM). Na figura “b”, na presença de anetol (1 mM). As barras horizontais representam o tempo de exposição da preparação ao perclorato e ao anetol. Os símbolos fechado (●) e aberto (○) representam respectivamente o momento em que a preparação foi submetida a 100 mM de K⁺ ou 4 mM de K⁺. Calibração: a barra vertical indica encurtamento (em cm) e a horizontal o tempo (em min.). Em “c”: representação gráfica dos efeito da interação do íon perclorato (1 a 60 mM) e anetol (1 mM) em preparações mantidas em solução contendo 100 mM de K⁺. Nesta figura os símbolos fechados (●) e abertos(○) representam respectivamente a curva dose / resposta ao perclorato e aos valores dos encurtamentos obtidos em preparações submetidas às soluções contendo concentrações crescentes de perclorato e anetol (1 mM). A ordenada representa os valores de encurtamento (em percentagem) e a abcissa representa as concentrações de perclorato.

a:



b:

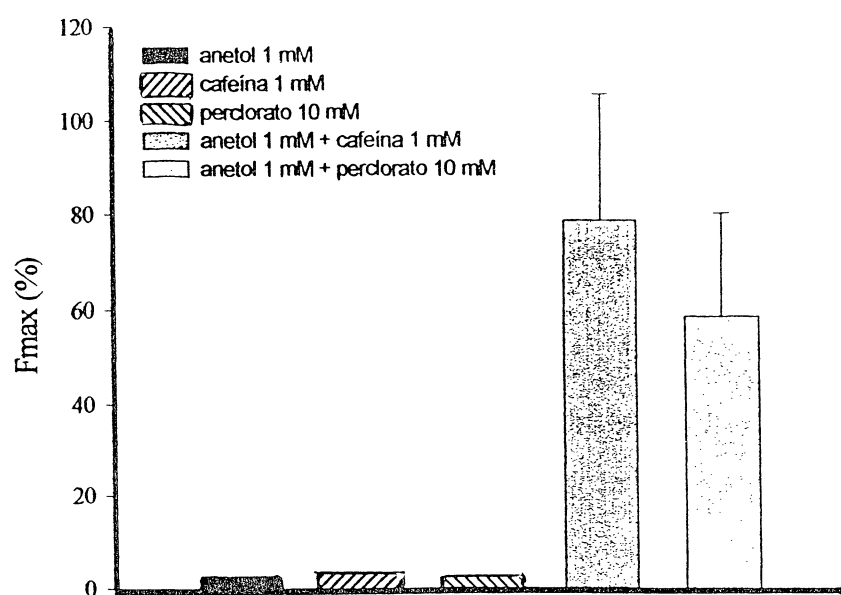
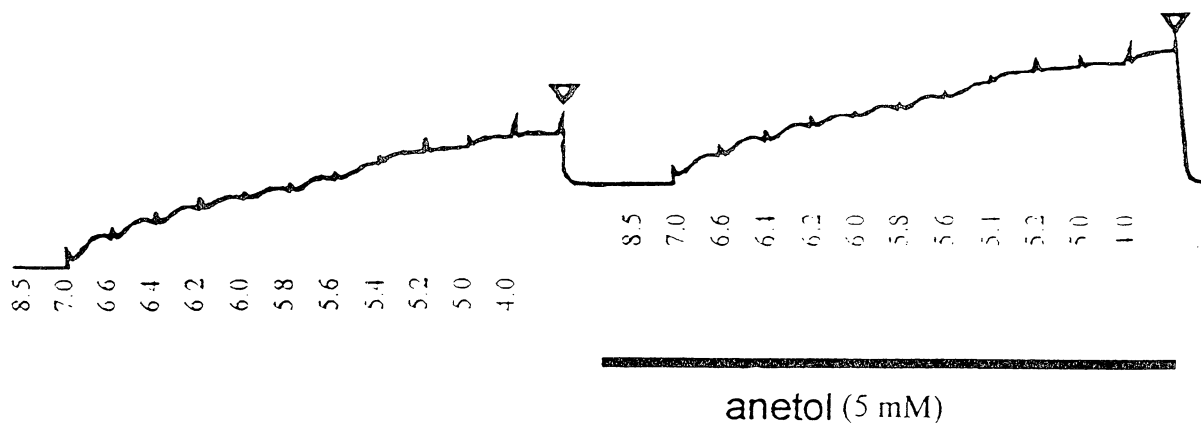


Fig. 18 – Efeito da interação da cafeína (1 mM) e do íon perclorato (10 mM)

A Fig. 18 representa o efeito da cafeína (1 mM) e do íon perclorato (1 mM) em contraturas de fibras de rã permeabilizadas com saponina com $n=6$. Em “a”: registro original de um experimento típico mostrando que após o carregamento do retículo sarcoplasmático com íons cálcio o anetol (1 mM) não induziu a contração da preparação. No entanto, quando ocorre carregamento do retículo sarcoplasmático com íons cálcio e combinamos com cafeína (1 mM) e perclorato (1 mM) com anetol (1 mM), pode-se observar liberação de cálcio e, por consequência, contração da fibra permeabilizada com saponina. O símbolo ($\uparrow$) representa os momentos de transferência da preparação para as soluções. Calibração: a barra vertical representa a forma em mM 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 com a média $\pm$ o erro padrão.

a



b

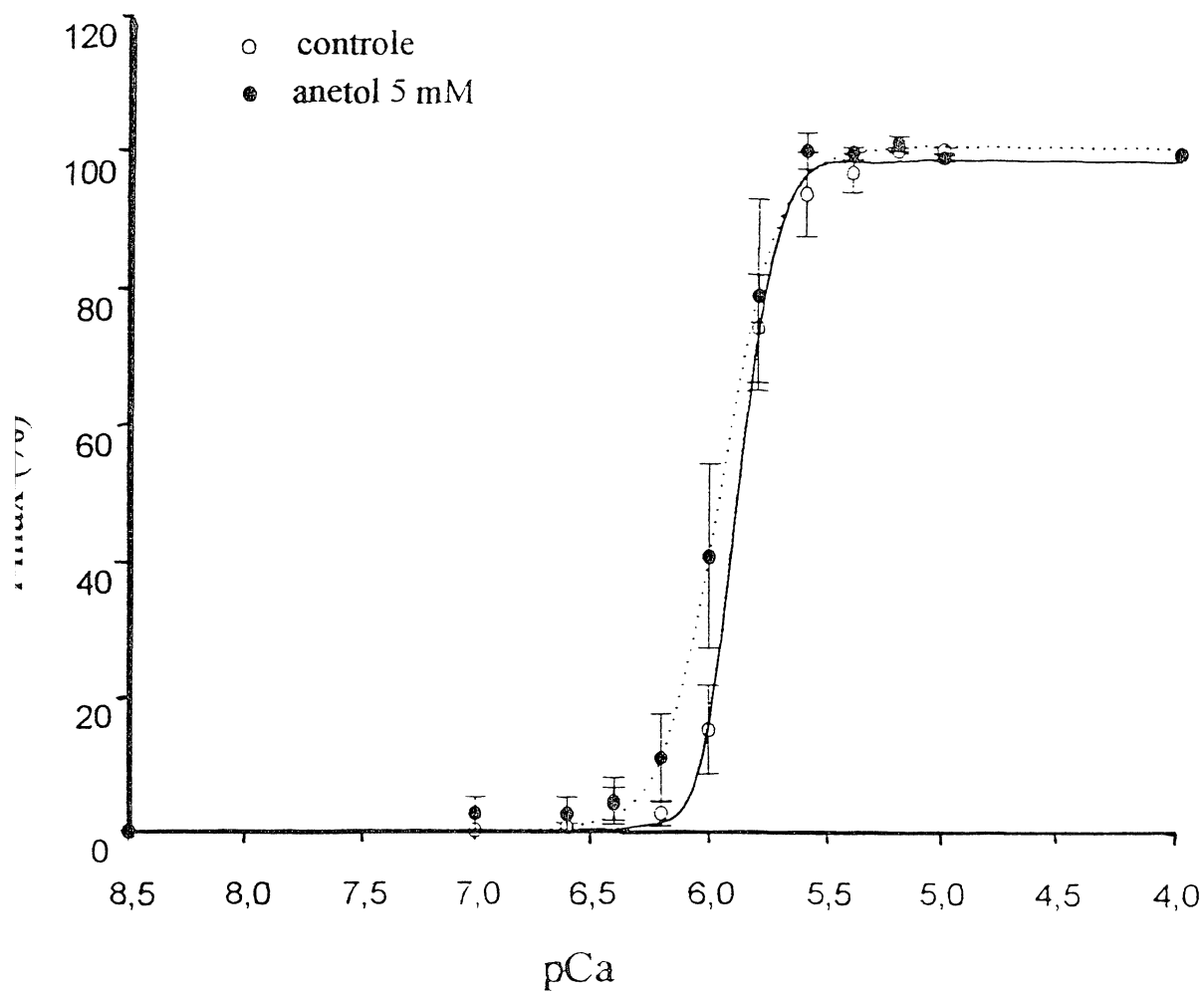


Fig. 19 – Efeito do anetol (5 mM) na relação força / $[Ca^{2+}]$

A Fig. 19 representa o efeito do anetol (5 mM) na relação força / $[Ca^{2+}]$ em fibra permeabilizada com Trinton 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 anetol (5 mM) (segunda curva). A barra horizontal representa o tempo em que a preparação esteve exposta a 5 mM de anetol, conforme indicado na figura. Calibração: a barra vertical representa a força em mN e a horizontal o tempo em segundos. Em “b”: representação gráfica dos dados obtidos conforme protocolo demonstrado em “a”. Os círculos aberto ($\circ$) e fechado ($\bullet$) representam, respectivamente, os resultados obtidos, na ausência e presença de anetol 5 mM. 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.

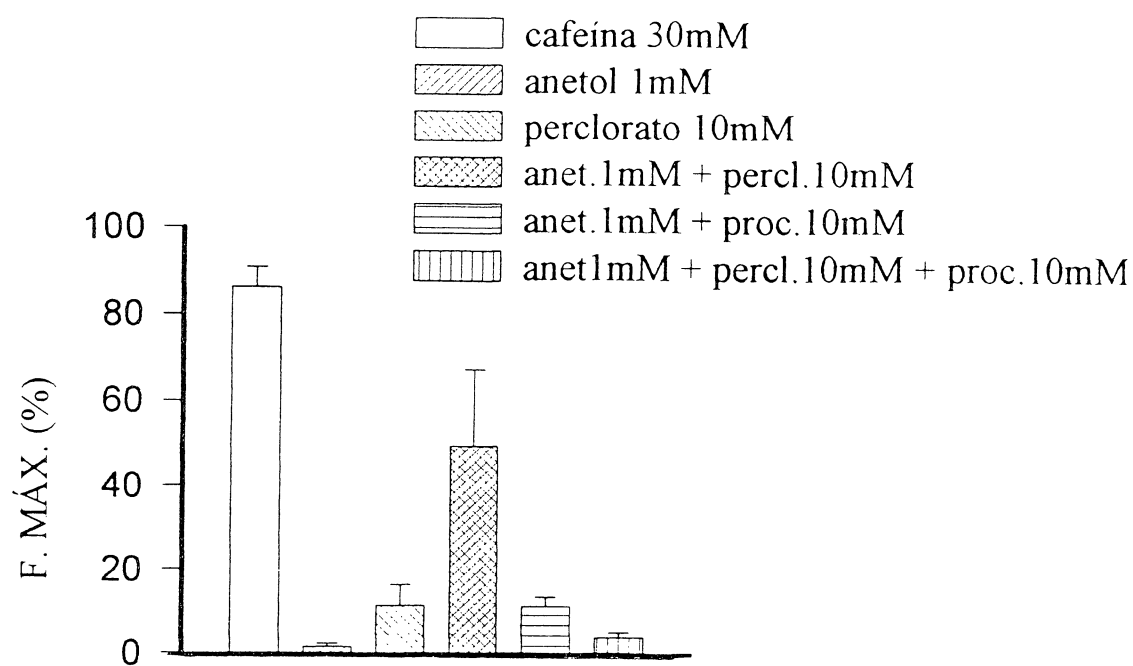
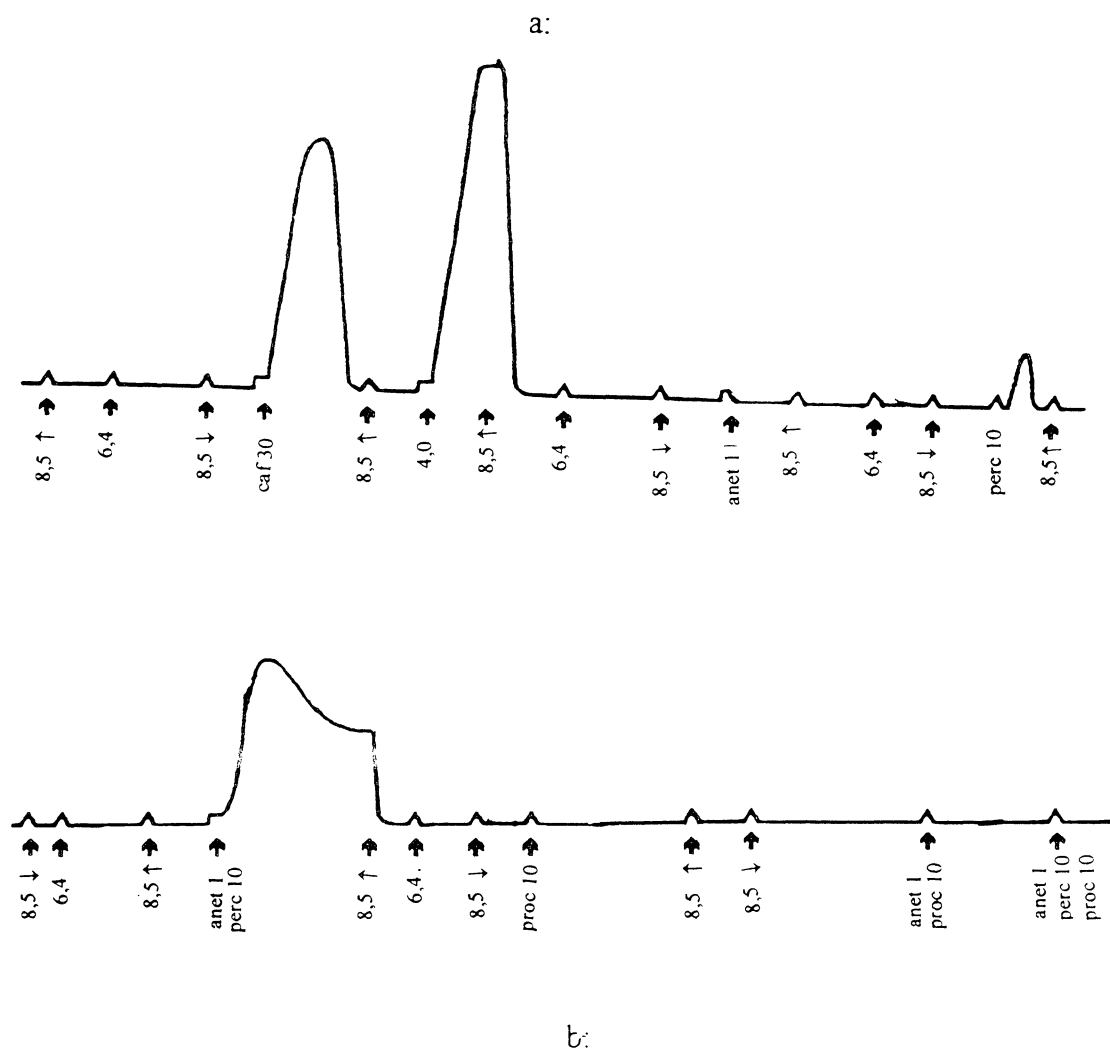


Fig. 20 – Efeito da Procaína (10 mM) sobre contraturas induzidas pelo anetol (1 mM)

A Fig. 20 representa o efeito da procaína (10mM) nas contraturas induzidas pelo anetol (1 mM) e perclorato (10 mM) em fibra permeabilizada com saponina. Em “a”: registro original de um experimento típico, mostrando o efeito contraturante do perclorato e bloqueio desta contração pela procaína. Após o retículo ter sido carregado com cálcio (pCa 6.4), a adição do perclorato ou da cafeína à solução contendo 8.5 com EGTA 0,5 mM, induziu a contração da fibra muscular. A prévia incubação da preparação com procaína (10 mM) por 10 minutos foi seguida por um carregamento de retículo. A presença deste anestésico local promoveu o bloqueio da contração induzida pelo perclorato (10 mM) e cafeína (30 mM). A presença do anetol (1 mM) não modificou este resultado. Calibração: a barra vertical representa a forma mM e a horizontal o tempo em segundos. Em “b” representação gráfica dos valores de força contrátil induzidos pela cafeína (30 mM), anetol (1 mM), perclorato (10 mM) e cada um destes compostos na presença de procaína (10 mM). Os dados estão expressos como valores percentuais de força obtida por ativação máxima do sistema contrátil. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram utilizados vários compostos que interferem no mecanismo de AEC com objetivo de contribuir para o entendimento deste mecanismo de transdução de sinal. Em músculo intacto verificou-se que o anetol, nas concentrações entre 0,03 e 3,3 mM bloqueou de forma dose-dependente a contratura induzida pela despolarização da membrana plasmática (sarcolema) (fig. 8) pelo íon potássio. Este efeito poderia ser decorrente do bloqueio de canais de potássio, da transdução do sinal elétrico da membrana plasmática dos túbulos T para os receptores existentes na membrana da cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (RiR), da liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático (por um efeito direto sobre os RiR), bloqueio da ativação das proteínas do sistema contrátil ou de uma combinação destes efeitos. Neste estudo não investigamos a possibilidade do anetol bloquear a contratura potássica por bloquear a despolarização induzida por este íon. Contudo, estudos realizados por Albuquerque e colaboradores (ALBUQUERQUE *et al* 1984) demonstraram que este constituinte de óleos essenciais não alterou o potencial transmembrana de células musculares esqueléticas mantidas em Ringier normal ou com altas concentrações de potássio. Assim sendo, é pouco provável que o bloqueio da contratura potássica induzida pelo anetol seja decorrente do bloqueio da despolarização induzida por este íon. O anetol pode estar interferindo com a transdução do sinal elétrico, a partir da membrana do sistema tubular transverso para o retículo sarcoplasmático. Este mecanismo tem sido amplamente estudado (SCHNEIDER e CHANDLER, 1973). Acredita-se que o acoplamento mecânico entre os receptores dihidropiridínicos presentes na membrana do sistema tubular transverso com os receptores RiR na membrana da cisterna terminal do retículo sarcoplasmático seja feita de forma mecânica (RIOS e PIZARRO, 1991). 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 RS e assim, desencadeia a contração muscular (SCHNEIDER e CHANDLER, 1973; RIOS e PIZARRO, 1991). A possibilidade de que o anetol bloqueie a transdução deste sinal deve ser considerada. O ânion perclorato potencializa o processo de AEC em músculo

esquelético, deslocando a relação do potencial transmembrana/força para a esquerda (DULHUNTY *et al*, 1992; CSERNOCH *et al*, 1999). Os dados obtidos neste trabalho confirmam os existentes na literatura. A pré-incubação de preparações com perclorato (2 mM) e a substituição da solução de Ringer contendo 4 para uma solução contendo 40, 80 ou 100 mM de potássio potencializou a contratura induzida por essas concentrações de potássio, deslocando assim a curva encurtamento muscular / concentração extracelular de K^+ para a esquerda. Resultados semelhantes a este, também foram obtidos por Dulhunty (DULHUNTY *et al*. 1992). Considerando que o perclorato é uma substância que potencializa a interação dos receptores DHPR / RiR, estes dados sugerem que o efeito do anetol, provavelmente ocorra no passo de transdução do sinal dos receptores dihidropiridínicos para o retículo sarcoplasmático. A ausência dos efeitos do perclorato, mesmo quando utilizando 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 aumento da concentração extracelular de K^+ seja decorrente de um efeito do retículo sarcoplasmático. Da mesma forma, se o efeito potencializador da contratura induzida pelo perclorato fosse semelhante ao efeito da cafeína, esperar-se-ia uma potencialização quando de sua associação com anetol. Isto porque este último potencializa os efeitos da cafeína (Figuras 9 e 10), conforme demonstrado neste trabalho e também por Albuquerque e colaboradores (ALBUQUERQUE *et al* 1984). Da mesma forma, esperar-se-ia que o efeito do perclorato se manifestaria em preparações com qualquer valor de potencial de membrana. Tal potencialização, contudo não foi verificada quando as preparações foram mantidas em solução contendo 100 mM de K^+ . A contração muscular induzida pelo perclorato somente foi observada em solução contendo 4 mM de K^+ , o que sugere que a ação deste ânion depende do estado de potencial transmembrana e por conseqüência, do estado dos receptores dihidropiridínicos. Com estes resultados pode-se supor que com o aumento da concentração extracelular de potássio de 4 para 100 mM, o valor do potencial da membrana nessa concentração de K^+ é suficiente para inativar os receptores

dihidropiridínicos (OBA *et al.*, 1997) e assim bloquear a contratura induzida pelo perclorato.

Em músculo esquelético a principal fonte de íons cálcio necessária para desencadear o processo contrátil é o retículo sarcoplasmático. As contrações musculares obtidas em preparações permeabilizadas com o uso de saponina foram bloqueadas pela procaína, uma substância que bloqueia a liberação de íons cálcio do RS (ENDO, 1985). Os resultados obtidos por Leal-Cardoso (LEAL-CARDOSO *et al.* 1994) demonstraram que a prévia incubação de músculo sartório de sapo com a procaína foi eficiente como bloqueador da contratura induzida pelo eugenol.

Também foi estudado neste trabalho o efeito do anetol e do perclorato isoladamente e em combinação, levando em conta que este efeito pudesse ser devido a um efeito direto no sistema contrátil. Para tal foi empregada a técnica de fibra permeabilizada com Triton X – 100. Esta técnica possibilita avaliar os efeitos diretos de substâncias no sistema contrátil porque o Triton X – 100 é um detergente não iônico que solubiliza todos os elementos membranosos da célula, mantendo íntegro e funcional apenas o sistema contrátil. Neste caso, a ativação do sistema contrátil é obtida com a adição de diferentes concentrações de íon cálcio. Assim, pôde-se observar o grau de cooperatividade das proteínas do sistema contrátil bem como a sensibilidade ao íon cálcio. Enquanto a cooperatividade do sistema é dada 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 anetol não alterou a sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio ou a cooperatividade do mesmo (fig. 19). Estes dados sugerem que a afinidade da troponina C pelo cálcio não foi alterada pelo anetol. 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.

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 nesta organela (fig. 18). Como nestas preparações o potencial transmembrana não é mantido, pois a

saponina ao reagir com grupamentos de colesterol da membrana, faz com que a mesma perca suas propriedades seletivas (LAUNIKOS e STEPHENSON, 1997), a possibilidade de que o íon perclorato venha a ativar os receptores dihidropiridínicos é pouco provável. Assim, é possível que este ânion venha atuar no receptor rianodínico. Efeitos semelhantes foram obtidos em estudos onde se empregaram vesículas isoladas de cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (YANO *et al*, 1995). Estes autores verificam que o perclorato, quando empregado em concentrações acima de 10 mM, foi capaz de induzir a liberação de íons cálcio. Verificou-se que em RiR 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 / RiR é realizada em ambas as direções (BERS e FILL, 1998; MARXS *et al*, 1998; CSERNOCH *et al*, 1999), a possibilidade de o perclorato atuar diretamente nos receptores RiR não pode ser afastada.

Pelo exposto, percebe-se que não há conclusões possíveis porque o mecanismo de contração muscular ainda não está completamente elucidado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B. A., T. TANABE, A. MIKAMI, S. NUMA and K. G. BEAM. Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptors cDNAs. **Nature** 346:569-572, 1990.
- ALBERTS, B. BRAY, D.; LEWIS, J. MARTIN, R.; ROBERTS K; WATSON, JD THE CYTOSKELETON. In: **Molecular biology off the cell**. Third edition. New York: Garland Publishing. Inc. 1997. p. 847-857.
- ALBUQUERQUE, A. A. C. ; SORENSON, A. L.; LEAL-CARDOSO, J. H.(1995). Effects of essencial oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. **J. of Ethnopharmacology**, 49 (1995) 41-49.
- ALBUQUERQUE, A. A.C.; NETO, J. X.; FILHO, J. D.; VIANA, G. S. B.; LEAL - CARDOSO, J. H.(1984). Effects of essencial oil of *Croton zehntneri*, estragole and anethole on nerve and skeletal muscle. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**, Fortaleza, 24 (2): 19-27.
- AXELSON, J. E THESLEFFS, S. Activation of the contractile mechanism in striated muscle. **Acta Physiol.** Scand 44: 55-56. 1958.
- BERS. M. D. E FILL. M. Coordinated feet and the dance of ryanodine receptors. **Science**, 281: 790-791. 1998.
- BLOCK, B. A. Thermnogenesis in muscle. **Annu. Rev. Physiol.** V.56, p. 535-537, 1996.
- BLOCK, B. A., J. O'BRIEN and J. FRANK. The role of ryanodine receptor isoforms in the structure and function of the vertebrate triad. In: **Organellar ion channels and transporters**, edited by D.E. Clapham and B. E. Ehrlich. New York: Rockefeller Univ. Press, 1996, p.47-65.
- BLOCK, B. A., T. IMAGAWA, K.P.KAMPBEL, and C. FRANZINI-ARMSTRONG. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule / sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. **J. Cell Biol.** 107:2587-2600, 1988.
- BLOCK, B. A.; IMAGAWA, T.; CAMPBELL, K.P.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. Strutural evidence for direct interaction between the components of the tranverse tubule / sarcoplasmic reticulum junction in the skeletal muscle. **J. Cell Biol.** n107, p. 2587-2600, 1988.
- BOISSIER, J. R. et al. Experimental psychotropic effect of isomeric cis-and-trans anetholes. **Thérapie**, 22: 309-23, 1967.

BRENNER, B. Mechanical and structural approaches to correlation of cross-bridge action in muscle with actomyosin ATPase in solution. **Annu. Rev. Physiol.** V. 49, p. 655-672, 1987.

_____. 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 research in cardiology** 81, 1-15. 1986.

BRENNER, B. E. YU, L. C. Structural changes in the actomyosin cross-bridges associated with force generation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90, 5252-5256. 1993.

BRILLANTES, A., P. ALLEN, T. TAKAHASHI, S. IZUMO and A. MARKS. Differences in cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) expression in myocardium from patients with end-stage heart failure caused by ischemic versus dilated cardiomyopathy. **Circ. Res.** 71:18-26, 1992.

BRILLANTES, A. M. B., K. ONDRIAS, A. SCOTT, E. KOBRINSKY, E. ONDRIASOVA, M.C. MOSCHELLA, T. JAYARAMAN, M. LANDERS, B. E. EHRLICH and A. R. MARKS. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK-506 binding protein. **Cell** 77:513-523, 1994.

BRILLANTES, A. M. B.; ONDRIAS, K.; SCOTT, A.; KOBRINSKY, E.; ONDRIASOVA, E.; MOSCHELLA, M. C.; JAYARAMAN, T.; LANDERS, M.; EHRLICH, B. A.; MARKS, A. R. Stabilization of calcium release by FK 506 – Binding Protein. **Cell**, V. 77. P. 513-523, may, 1994.

BULBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm. **Brit. J. Pharmacol.** 1:38-61, 1946.

CALLAWAY, C. SERYSHEV, J. P., WANG, K. J., SALVIK, D. H., NEEDLEMANN, C. CANTU, Y, MARKS, A. R. HAMILTON, S. L. Localization of the high and low affinity [H_3] ryanodine binding sites on skeletal muscle Ca^{2+} release channel. **J. Biol. Chem.** 269: 15876-15884. 1994.

CAMPBELL, K. P.; KNUDSON, C. M.; IMAGAWA, T.; LEUNG, A. T.; SUTKO, J. L.; KAHL, S. D.; SAAB, C. R.; MADSON, L. Identification and characterization of the high affinity [3H] ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel **J. Biol. Chem.** V.262, p. 6460-6463, 1993.

CATTERALL, W. A. Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. **Cell** 64: 871-874, 1991.

COOKE, R. Actomyosin interaction in striated muscle. **Physiological reviews**, V.77, n3, 1997.

_____. The mechanism of muscle contraction, critical reviews in biochemistry V.21. **Issue I.** 1986.

CORONADO, R. MORRISSETTE, J. SUKHAREVA, M. VAUGHON, D. M. Structure and function of ryanodine receptors. **A.M. J. Physiol.** V. 266 (Cell physiol. 35) p. C. 1485 – C 1504, 1994.

CSERNOCH, L. KOVÁCS, L. SZUCS, G. Perchlorate and the relationship between charge movement and contractile activation in frog skeletal muscle fibers. **J. Physiol.** Lond. 390: 231-227. 1987.

CSERNOCH, L. SZENTESI, P. KOVACS, L. Differential effects of caffeine and perchlorate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle. **J. of Physiol.** 520. 1: 217-230. 1999.

DULHUNTY, A. F.; LAVER, D. R.; GALLANT, E. M.; CASAROTTO, M. G.; PACE, S. M.; CURTIS, S. Activation and inhibition of skeletal R₁R channels by a part of the skeletal DHPR II-III loop: effects of DHPR ser 687 and FKPR 12. **Biophys. J.** V.77, n1, p. 189-203, jul, 1999.

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

ENDO, M. **Calcium release from sarcoplasmic reticulum.** Current topics in membranes and transport. V.25, p.181-230, 1985.

FABIATO, A. and F. FABIATO. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. **Annu. Rev. Physiol.** 41:743-756, 1984.

FARAH, C. S.; REINACH, F. C. Regulatory properties of recombinant tropomyosins containing 5-hydroxytryptophan: Ca²⁺ - Binding to troponin results in a conformation change in a region of tropomyosin outside the troponin binding site. **Biochemistry.** V.38:32, p. 10543-10551, aug, 1999.

FELDMEYER, D. E LÜTTGAU, H. C. The effect of perchlorate on Ca²⁺ currents and mechanical force in skeletal muscle fibers. **Pflügers archiv.** 411, R190. 1988.

FLEISCHER, S. and M. INUI. Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. **Annu. Rev. Biophys. Chem.** 18:333-364, 1989.

FLUCHER, B. E.; CONTI, A.; TAKESHIMA, H.; SORRENTINO, V. Type 3 and type 1 receptors are localized in triads of the same mammalian skeletal muscle fibers. **J. Cell. Biol.** V. 146, n3, p. 621-630, aug, 1999.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; JORGENSEN, A. O. Structure and development of E-C coupling units skeletal muscle. **Annu. Rev. Physiol.** n56, p. 509-534, 1994.

_____. Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. **Annals Rev. Physiol.** 56:509-534, 1994.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. and G. NUNZI. Junctional feet and membrane particles in the triad of a fast twitch muscle fiber. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 4:233-252, 1983.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. and J. W. KISH. Alternate disposition of tetrads in peripheral couplings of skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 16:319-324, 1995.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. and PROTASI, F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol. Rev.* 77 n° 3:699-729, 1997.

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

GARRETT, R. H; GRISHAN, C. M. Muscle Contraction. In: **Molecular aspects of cell biology**. Orlando: Saunders College Publishing, 1995. p. 1156-1176.

GILBERT, R.; COHENT, J. A.; PARDO, S.; BASU, A.; FEISCHMAN, D. A. Identification of the binding proteins C and H (MYBP-C, MYBP-H) in skeletal muscle. *J. cell. Sci.*, V.112 (Pt 1), p. 69-79, jan, 1999.

GO, L. O., M. C. MOSCHELLA, J. WATRAS, K. K. HANDA, B. S. FYFE and A. R. MARKS. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J. Clin. Invest.* 95:888-894, 1995.

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

GODT, R. E., BROTTTO, M. A. P. FOGAÇA, R. T. H. E NOSEK, T. M. Uptake and release of calcium by sarcoplasmic reticulum (SR). In: **Saponin-skinned striated muscle of lobster**. *Faseb. J.* (Abstract). 1994.

GODT, R. E., FOGAÇA, R. T. H., BROTTTO, M. A. P., KASSOUF - SILVA, I. E NOSEK, T. M. 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). 1993b.

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

GODT, R. E.; FOGAÇA, R. T. H.; ANDREWS, M. A.; W & NOSEK, T. M. 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 (1993).

GOLDMAN, Y. E; BRENNER, B. Special topic: molecular mechanism of muscle contraction. **Ann. Rev. Physiol**, V.9, p 629-635, 1987.

GOMOLA, M. G. GOTTSCHALK, L. LÜTTGAU, H. C. Perchlorate induced alteration in electrical and mechanical parameters of frog skeletal muscle fibers. **J. Physiol. Lond**, 343: 197-214. 1983.

GONZALEZ, A. E RIOS, E. Perchlorate enhances transmission in skeletal muscle excitation-contraction coupling. **J. Gen. Physiol.** 102: 373-421. 1993.

GORDON, A. M; H. Regulation of contraction in striated muscle. **Physiological reviews**, Vol.80, n2, p 853-924, april 2000.

GROH, S.; MART, I.; OTTOLIA, M.; PRISTIPINO, G.; CHAPEL, A.; VILLAZ, M.; RONTAT, M.; Functional interaction of the cytoplasmic domain of triadin with the skeletal ryanodine receptor. **The journal of biological chemistry**, V.274, n18, p. 12278-12283, 1999.

HAK, J. B., VAN BEEK, J. H. G. M. E WESTERHOF, N. **Acidosis slows the response of oxidative phosphorylation to metabolic demand in isolate rabbit heart.** 423, 324-329. 1993.

HERRMANN FRANK, A. LÜTTGAU, H. STEPHENSON, D. G. Caffeine and excitation-contraction coupling in skeletal muscle: a stimulation story. **J. of Musc. Res. And Cell. Motility**, 20: 223-237. 1999.

HIJIKATA, T.; MURAKAMI, T.; IMAMURA, M. FUJIMAKI, N.; ISHIKAWA, H.; Plectin is a linker of intermediate filaments to Z-discs in skeletal muscle fibers. **J. Cell. Sci.** V.112 (Pt 6) p. 867-876, mar, 1999.

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

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

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

HUXLEY, S. A. **Reflections on muscle.** Liverpool university press, 1980, p1-111.

JAYARAMAN, T., A. M. B. BRILLANTES, A. P. TIMERMAN, H. ERDJUMENT-BROMAGE, S. FLEISHER, P. TEMPST and A. R. MARKS. FK506 binding protein associated with the calcium release channel(ryanodine receptor). **J. Biol. Chem.** 267:9474-9477, 1992.

KAFTAN, E., A. R. MARKS and B. E. EHRLICH. Effects of rapamycin on ryanodine receptor/calcium release channels from skeletal and cardiac muscle. **Circ. Res.** 78:990-997. 1996.

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

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

KOBAYASHI, T.; ZHAI, X.; WADE, R.; COLLINS, J. H. Ca^{2+} dependent interaction of the inhibitory region of troponin I with acidic residues in the n-terminal domain of troponin C. **Biochim. Biophys. Acta**, V. 1430, p. 214-221, mar, 1999.

LEAL-CARDOSO, J. H. COELHO de Sousa, A. N. Sousa, E. T. FIGUEIREDO, I. M. B. Effects of eugenol on excitation-contraction coupling in skeletal muscle arch. Inter. **Pharmacol. Therap.** 327: 113-124. 1994.

LEAL-CARDOSO, J. H. E FONTANELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **An. Acad. Bras. Ci** 71(2). 1999.

LEAL-CARDOSO, J. H., COELHO DE Sousa, A. N. FIGUEIREDO, I. M. B., MILFONT, J. M. B., Sousa, I. T. Benzyl-eugenol antagonizes the contracture induced by eugenol on skeletal muscle. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará** 1-2, 35-39. 1988.

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

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

MARKS, ANDREW R. (1997). Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. **The Am. Physiol. Society**. H597-605.

MEISSNER, G. E FLEISHER, S. Characterization of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. **Bioquímica et Biophysica acta**, 24: 356-378. 1971.

MEISSNER, G. Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, V.389, p. 51-68, 1995.

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

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

MEISSNER, G.; RIOS, E.; TRIPATHY, A.; PASEK, D. A. Regulation of skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptor) by Ca^{2+} and monovalent cations and anions. **The Journal of Biological Chemistry**, V. 272, n3 p. 1628-1638, January, 1997.

MILLER, C. **Ion Channel Reconstitution**. New York: Plenum, 1986.

MILLER, C. J.; CHEUNG, P.; WHITE, P.; REISLER, E. Actin view of actomyosin interface. **Biophys. J.** V.68, Suppl p. 550-554, 1995.

MOSS, R. L. & HOFMANN, P.A. (1992). **Cellular and molecular basis of muscle contraction. In metabolic pumps and intracellular homeostasis, and contractility**, Ed. Bittar, E., pp. 185-237.

NAYLOR, G. R. S. BARTELS, E.M., BRIDGMAN, T. D. & ELLIOT, G. F. Donnan potentials in rabbit psoas muscle in rigor. **Biophys. J.** 48: 47-59. 1985.

NOSEK, T. M.; LEAL – CARDOSO, J. H.; MALAUGHLIN, M & GODT, R. E. Inhibitory influence of phosphate and arsenate on contraction of skinned skeletal and cardiac muscle. **AM. J. Physiol.** 259, C 933- C 939. 1990.

POTTER, J. D.; SHENG, Z.; PAN, B. S.; ZHAO, J. A Direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca^{2+} regulation of muscle contraction. **J. Biol. Chem.**, V.270: 6 p 2557-2562, feb, 1995.

PROTASI, F.; FRANZINI – ARMSTRONG, C.; ALLEN, P. D. Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release units in skeletal muscle. **J. Cell. Biol.** V.140, n4, p. 831-842, feb, 1998.

RADERMACHER, M., V. RAO, R. GRASSUCCI, J. FARNK, A. TIMMERMAN, F. S. and WAGENKNECHT. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. **J. Cell Biol.** 127:411-423, 1994.

RIOS E. Ma. J.; GONZALEZ, A. The mechanical hypothesis of excitation-contraction coupling. **J. Muscle res. Cell. Motil.** V.12, p. 127-135, 1991.

RIOS, E. KARHANEK, M. MA, J. an allosteric model of transmission in E-C coupling (abstract). **Biophys J** 61: A 131. 1992.

RIOS, E. PIZARRO, G. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Physiol. Rev.** 71 n°03: 849-908. 1991.

RIOS, E.; BRUM, G. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Nature**, V.325, p. 717-720, 1987.

RIOS, E.; KARHANEK, M.; MA, J.; GONZALEZ, A. Na allosteric model of the molecular interactions of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **J. Gen. Physiol.** V.102, p. 449-481, 1993.

ROUSSEAU, E. LADINE, J., LIU, Q., MEISSNER, G. Activation of the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. **Arch. Biochem. Biophys.** 267: 75-86.1988.

SANDOW, A. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Pharmac. Rev.** 17: 265-320. 1965.

SARKOZI, S. SZENTESI, P. CSERI, J. KOVACS, L. CSERNOCH, L. Concentration - dependent effects of tetracaine on excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. **J. Muscle Res. Cell. Motil.** 1996.

SERYSHEVA, I., E. V. ORLOVA, W. CHIU, M. B. SHERMAN, S. L. HAMILTON and M. VAN HEEL. Electron cryomicroscopy and angular reconstitution used to visualize the skeletal muscle calcium release channel. **Nature Struct. Biol.** 2;13-24, 1995.

SMITH, J.; CORONADO, R.; MEISSNER, G. Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca^{2+} , and ATP and modulation by Mg^{2+} . **J. Gen Physiol.** V.88, p. 573-588, 1989.

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

TANABE, T. BEAM, K. G. ADAMS, B. A., NIIDOME, T. NUMA, S. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. **Nature**, V. 346: 567-569. 1990.

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

TANABE, T.; BEAM, K. G.; POWELL, J. A.; NUMA, S. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle complementary DNA. **Nature**. V.336, p. 134-139, 1988.

TIMERMAN, A. P., E. OGUNBUNMI, E. FREUD, G. WIEDERRECHT, A. MARKS and S. FLEISHER. The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506 binding protein. **J. Biol. Chem.** 268: 22992-22999, 1993.

TIMERMAN, A. P., T. JAYARAMAN, G. WIEDERRECHT, H. ONOUE, A. MARKS and FLEISCHER. The ryanodine receptor from canine heart sarcoplasmic reticulum is associated with a novel FK-506 binding protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 198:701-706.1994.

TSUDA, S.; MIURA, A.; GAGNÉ, S. M.; SPYRACOPOULUS, L.; SYKES, B. D. Low temperature induced structural changes in the apo regulatory domain of skeletal muscle troponin **C. Biochemistry** V.38:18, p.5693-5700, may, 1999.

WANG, C. K. LIAO, R. & HEUNG, H. C. (1993). Rotational dynamics of skeletal muscle troponin C. **J. Biol. Chem.** 268, 14671-14677.

WANG, Z. GERGELY, J. E TAO, T. Characterization of the Ca^{2+} triggered conformational transition in troponin C. **Proc Natl. Acad. Sci. USA.** 89, 11814-11817. 1992.

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

YANO, M. EL-HAYER, R. E IKEMOTO, N. 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. 1995.

ZHU, X.; GURROLA, G.; JIANG, M. T.; WALKER, J. W.; VALDIVIA, H. H. **Conversion of inactive cardiac dihydropyridine receptor II-III loop segment in to forms that active skeletal ryanodine receptor fesh lett** V.450, n3, p. 221-226, may, 1999.

ZHU, Y & NOSEK T. M. Ruthenium red effects the contractile apparatus but not sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release of skinned papillary muscle. **PF Lagers arc.** 420, 255-258.

ZOT, A. S. E JAMES, D. POTTER. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. **Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chems.** 195, 535-559. 1987.

ZOT, A. S. POTTER, J.D. Strutral aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. **Annu. Rev. Biophyschem**, V.16, p 535-559, 1992.