

Papel do cálcio extracelular e do segundo mensageiro de cálcio ADPR na resistência à fadiga e função contrátil de fibras musculares esqueléticas

Palavras-Chave: 1. Músculo esquelético, 2. Dinâmica de cálcio, 3. Fadiga

Autores(as):

MATHEUS CHIARADIA GREGUER, FEF – UNICAMP

Prof. Dr. PAULO GUIMARÃES GANDRA (orientador), IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A contração do músculo esquelético depende do acoplamento dos processos de excitação-contração das fibras musculares. Quando a fibra é excitada, íons cálcio (Ca^{2+}) são liberados do retículo sarcoplasmático (RS) para o citosol. O aumento da concentração de Ca^{2+} livre no citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) promove sua ligação às proteínas contráteis, resultando na geração de força e/ou encurtamento da fibra. Terminado o estímulo, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ retorna ao valor de repouso e a fibra relaxa.

De forma geral, a maior parte do Ca^{2+} liberado do RS durante a estimulação do músculo esquelético, é recaptada por meio da ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Porém, durante períodos prolongados de estimulação, pode ocorrer um efluxo de Ca^{2+} para o meio extracelular. Esse cálcio perdido pode ser repostado pelo influxo via diferentes mecanismos, a fim de evitar que a concentração de cálcio disponível no retículo sarcoplasmático diminua de modo a afetar a geração de força. Estudos preliminares sugerem que o cálcio extracelular não é essencial para a resistência à fadiga durante períodos relativamente curtos de estimulação máxima em músculos predominantemente compostos por fibras do tipo II. Entretanto, ainda não é claro se o cálcio extracelular é importante para resistência à fadiga durante períodos prolongados de estimulação submáxima nesse mesmo tipo de fibra.

Um possível mecanismo de entrada de cálcio nas células musculares é o canal de membrana “*transient receptor potential melastatin 2*” (TRPM2). Em modelos animais knockout para TRPM2, observou-se diminuição da amplitude de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante a estimulação, sugerindo que esse canal pode ser importante na regulação do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no músculo esquelético. O TRPM2 é ativado por um segundo mensageiro de cálcio derivado de NAD^+ , a adenosina difosfato ribose (ADPR). No entanto, ainda não

são claros os papéis do TRPM2 e do ADPR endógeno na geração de força durante em períodos de estimulação que induzem a fadiga. As vias de formação de ADPR e sua forma cíclica, o cADPR, no músculo esquelético permanecem pouco elucidadas. A enzima multifuncional CD38 é apontada como uma das principais responsáveis pela síntese de ambos, a partir de NAD^+ . Como a CD38 deve formar maiores quantidades ADPR do que de cADPR, é provável que o ADPR possa exercer papel mais relevante na regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no músculo esquelético.

Hipóteses

As hipóteses deste projeto são que o cálcio extracelular é importante para resistência à fadiga durante períodos prolongados de estimulação submáxima em músculos predominantemente compostos por fibras do tipo II e que o ADPR, um ativador do canal iônico TRPM2, desempenha papel importante na regulação da função contrátil de fibras musculares esqueléticas durante períodos de atividade contrátil que induzem a fadiga.

METODOLOGIA

Obtenção do feixe de fibras intactas

Feixes de fibras musculares contendo ~10-20 células intactas foram isolados mecanicamente do músculo *flexor digitorum brevis* (FDB) de camundongos C57BL6J machos adultos (10-12 semanas de vida). O feixe foi dissecado utilizando pinças e micro tesouras sob um microscópio stereozoom com campo claro/escuro. Os tendões foram presos a clips de alumínio e assim conectados a um transdutor de força (Aurora Scientific 403A; Aurora Canadá) e a um gancho móvel em um sistema para análise de fibras isoladas (Aurora Scientific 801C; Aurora Canadá).

Protocolo Experimental

Os feixes de fibras intactas foram inicialmente alongados até o comprimento ótimo para a geração de força. Em seguida, foram submetidos a um protocolo que induz a fadiga, consistido em estimulações a 30 Hz, aplicadas a cada 4 segundos por um período total de 30 minutos (8 V; duração do pulso = 0,5 ms, duração do trem = 0,350 s; pulsos bifásicos, foi utilizado o estimulador Grass S88X; Grass, Quincy, MA, USA). Esse protocolo de longa duração foi escolhido porque, em condições de atividade contrátil prolongada, observa-se aumento da captação de cálcio a partir do meio extracelular.

Análise da importância do cálcio extracelular para a resistência à fadiga

Para avaliar a relevância do cálcio extracelular na função contrátil e na resistência à fadiga, dois grupos de feixes de fibras foram submetidos ao protocolo de fadiga (30 Hz a cada 4 segundos, por 30 minutos). Um grupo foi estimulado sob perfusão com solução de Tyrode contendo 1,8 mM CaCl_2 enquanto outro foi perfundido com solução isenta de CaCl_2 que foi substituído por quantidades equimolares de MgCl_2 . Todas as preparações foram mantidas a 32 °C e as soluções borbulhadas com gás contendo 95% de O_2 e 5% de CO_2 .

Análise da importância do ADPR endógeno na resistência à fadiga

Para investigar o papel do ADPR endógeno na resistência à fadiga, feixes de fibras foram incubados por 30 min em solução de Tyrode contendo 8-Br-ADPR (100 mM), um antagonista de ADPR. Após o período de incubação, os feixes foram submetidos ao protocolo de fadiga (30 Hz a cada 4 segundos por 30 minutos; 32 °C; solução Tyrode tamponada com HEPES). Os resultados obtidos nesse grupo tratado com 8-Br-ADPR foram comparados aos de um grupo controle, submetido ao mesmo protocolo, mas sem a adição do antagonista.

RESULTADOS

Papel do cálcio extracelular na resistência à fadiga

A resistência à fadiga se mostrou diminuída nos feixes estimulados na ausência de cálcio extracelular. Durante as contrações iniciais do protocolo de fadiga, ambos os grupos apresentaram queda semelhante na força pico. Entretanto, a partir do 18º minuto de estimulação, a força pico relativa à primeira contração foi significativamente menor nos feixes banhados por solução sem cálcio em comparação àqueles estimulados na presença de cálcio extracelular ($p = 0,04$). Ao final dos 30 min de estimulação, a força pico relativa foi de $50,65 \pm 11,87\%$ ($n = 5$) para os feixes contraindo na presença de cálcio extracelular, valor significativamente maior ao observado nos feixes contraindo na ausência de cálcio ($12,97 \pm 2,78\%$; $n = 6$; $p < 0,05$).

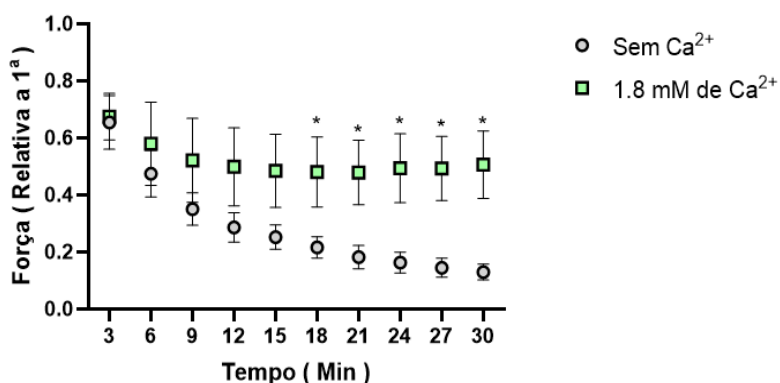


Fig 1. Força relativa ao longo do protocolo de fadiga. Os feixes foram estimulados em uma frequência de 30 Hz a cada 4 segundos por um período de 30 minutos na presença ($n = 5$) ou ausência de Ca^{2+} extracelular ($n = 6$); * $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias; Holm- Sidak)

Papel do ADPR endógeno na resistência à fadiga

Não foram observadas diferenças na geração de força pico gerada entre os feixes de fibras tratados com o antagonista de ADPR (8-Br-ADPR) e os feixes controle. Ao final do protocolo de fadiga, a força relativa foi $35,11 \pm 1,10\%$ no grupo controle e $31,14 \pm 5,05\%$ no grupo 8-Br-ADPR ($n = 3$ e $n = 4$ respectivamente; teste t não pareado; $p = 0,2487$).

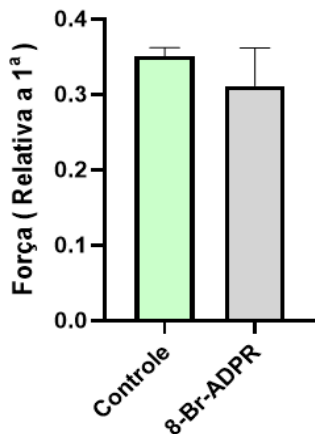


Fig. 2. Força relativa da última contração na condição controle e tratado com 8-Br-ADPR

CONCLUSÕES

Esses resultados indicam que o influxo de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular é determinante para a geração de força durante estimulações submáximas repetidas em músculos compostos predominantemente por fibras do tipo-II. Por outro lado, os achados sugerem que o ADPR endógeno, ativador do canal iônico TRPM2, não desempenha papel relevante na resistência à fadiga nessas condições.

BIBLIOGRAFIA

- 1- CAIRNS, Simeon P. et al. Role of extracellular $[Ca^{2+}]$ in fatigue of isolated mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, v. 84, n. 4, p. 1395–1406, 1998.
- 2- GERMINARIO, Elena et al. High-frequency fatigue of skeletal muscle: role of extracellular Ca^{2+} . *European Journal of Applied Physiology*, v. 104, n. 3, p. 445–453, 2008.
- 3- TARPEY, Michael D. et al. Characterization and utilization of the flexor digitorum brevis for assessing skeletal muscle function. *Skeletal Muscle*, v. 8, n. 1, p. 14, 2018.
- 4- CHO, C.-H. et al. A focus on extracellular Ca^{2+} entry into skeletal muscle. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 49, p. e378, 2017. DOI: 10.1038/emm.2017.208.
- 5- CHENG, A. J.; PLACE, N.; WESTERBLAD, H. Molecular basis for exercise-induced fatigue: the importance of strictly controlled cellular Ca^{2+} handling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 8, p. a029710, 2018. DOI: 10.1101/cshperspect.a029710.
- 6- GASSER, A. et al. Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 2489–2496, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M506525200.

- 7- PARK, D.-R. et al. CD38-cADPR-SERCA signaling axis determines skeletal muscle contractile force in response to β -adrenergic stimulation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 46, p. 2017–2030, 2018. DOI: 10.1159/000489441.
- 8- LEE, S.-H. et al. Exercise induces muscle fiber type switching via transient receptor potential melastatin 2-dependent Ca^{2+} signaling. *Journal of Applied Physiology*, v. 124, p. 364–373, 2018. DOI: 10.1152/japplphysiol.00687.2017.