UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

Efeito da Administração do Fosfato de Potássio na Concentração Sérica de Cálcio em Ratos (*in vivo*)

José Geraldo Ticianeli

dezembro
2007

Efeito da Administração do Fosfato de Potássio na Concentração Sérica de Cálcio em Ratos (*in vivo*)

José Geraldo Ticianeli

Texto de Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Prof. Alcimar Barbosa Soares, PhD.	Prof. Darizon Alves de Andrade, PhD.
Orientador	Coordenador do Curso de Pós-Graduação

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T555e Ticianeli, José Geraldo, 1968-
Efeito da administração do fosfato de potássio na concentração sérica de cálcio em ratos (*in vivo*) / José Geraldo Ticianeli. - 2007.
133 f. : il.

Orientador: Alcimar Barbosa Soares.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia biomédica - Teses. 2. Engenharia elétrica - Teses. I. Soares, Alcimar Barbosa. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica. III. Título.

CDU: 61:62

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

Efeito da Administração do Fosfato de Potássio na Concentração Sérica de Cálcio em Ratos (*in vivo*)

José Geraldo Ticianeli

Texto de Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, perante a banca de examinadores abaixo, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Banca Examinadora:

Prof. Alcimar Barbosa Soares, PhD - Orientador (UFU)
Prof. Adriano de Oliveira Andrade, PhD (UFU)
Prof[a]. Leonilda Stanziola, Dra. (UFU)
Prof. Marco Túlio de Melo, Dr. (UNIFESP)
Prof. Mário Antônio Baraúna, Dr. (UNITRI)

Dedicatória

À minha esposa Renata, por toda a trajetória de nossa vida e pelos momentos difíceis em que mais precisei foi em seus braços que encontrei todo o apoio, amor e sustentação para continuar nesta e em outras jornadas.

As minhas filhas, Yasmim e Maria Eduarda, por me ensinarem como a vida é bela. Em todos os momentos, são em seus abraços que encontro forças e ao mesmo tempo paz.

Aos meus pais, José Sebastião e Terezinha, pela minha vida, por terem me ensinado os meus primeiros passos que completam cada caminhada, por terem me ensinado as minhas primeiras palavras que completam cada frase, por terem ensino os valores éticos que completam cada atitude e, principalmente, a amar, que completo cada gesto que tenho com minha família.

Aos meus sogro e sogra, Renato (*in memorian*) e Maria Celina, por toda a atenção e carinho e, principalmente, por terem me confiado seu bem mais precioso.

Ao meu irmão André, pois sinto que em algum lugar, ele continua a acompanhar os meus passos e nos principais momentos da minha vida ainda sinto a sua grandiosa presença.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a Deus, por permitir que finalizasse este trabalho com saúde, fazendo com que os momentos difíceis que passei durante o desenvolvimento, fossem transformados em reforço para que continuasse a lutar.

Meu agradecimento especial ao Prof. Dr. Alcimar Barbosa Soares pela orientação, amizade e por ter permitido que todos os obstáculos pudessem ser superados para que este trabalho chegasse ao fim. Espero que Deus lhe retribua por tudo o que fez. Obrigado pela ajuda e confiança.

Ao Dr. Haroldo Campos, Presidente do Grupo Cathedral, a minha sincera gratidão pelas oportunidades e, principalmente, por oferecer todas as condições para que este doutorado pudesse ser realizado.

Ao amigo Prof. MSc. Edson Xavier pela preciosa amizade e pela disposição em ajudar no que fosse necessário.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Baraúna, por ter contribuído para que este sonho pudesse se transformar em realidade.

Ao amigo Prof. MSc. Paulo Tamashiro Filho, pela ajuda incondicional ao trabalho.

A Prof[a]. MSc. Sabrina Degaspore pela importante ajuda na parte experimental e na revisão do texto.

A Prof[a]. Kelly Cristiane Surian Becker pela realização da análise bioquímica e aos acadêmicos Wallace Bruno Ferreira Garcia e Sebastião Salazar Jansem Filho pela ajuda na realização da parte experimental.

Ao Prof. MSc. Antônio Valdeci Nobles, Prof. MSc. Marcelo Amaral da Silva e Prof. Jarbas Hernani Bohn pela preciosa amizade.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Imbrozio Barbosa pelo apoio na aquisição dos animais para a parte experimental.

A todos os amigos do Laboratório de Engenharia Biomédica: Guilherme, Virgílio, Marcelle, Ana Paula, Aílton, Sérgio, Adeílson, Lilian, Fábio, Rogério, em especial, ao Joaquim, Gláucia, Suzi, Wilton e Hugo que me ajudaram ao longo desta jornada.

Aos Prof. Dr. Keiji Yamanaka, Prof. Dr. Adriano A. Pereira, Prof. Dr. Adriano de Oliveira Andrade, Prof. Dr. Edgar Afonso Lamounier e Prof. Dr. Luciano Vieira Lima, obrigado pela compreensão e ajuda durante o transcorrer das disciplinas.

Aos coordenadores dos cursos de saúde: Denise, Sérvulo, Gilberto e Angélica. Obrigado pelo apoio e fidelidade.

Aos professores e funcionários da Cathedral, em especial, aos professores e amigos, André Russo, Jaberson, Bianca, Adriana Martins da Silva, Eliana da Silva e os

funcionários Auzenda Paula, Wilker, Jackson, Junio, Ana Paula, Cláudia, Daniel, Rossana, Maria e Francisca.

Um agradecimento especial aos meus grandes amigos Celso Martins da Silva, Marione, Fernanda e Paula.

À minha irmã Denise, agradeço por ter me acolhido nos primeiros momentos e me ensinado muito da vida, a meu cunhado Wagner, por ter me ajudado bastante no início da minha vida profissional e aos meus sobrinhos Luiz Felipe (afilhado), Luiz Fernando e Luiz Miguel.

Ao amigo Siloé da Costa Lima pela preciosa amizade e pela ajuda durante esta caminhada.

Aos meus cunhados Roberta, Rodrigo, Rafael e aos meus sobrinhos Ana Carolina e Flávio.

A todos aqueles que, diretamente ou indiretamente, permitiram a realização deste trabalho, que Deus os abençoe e agradeço por ter permitido a conclusão do mesmo.

MUITO OBRIGADO!

Sumário

Capítulo 1 - Introdução.....1

1.1 Motivação.....2

1.2 Hipótese.....5

1.3 Objetivo.....5

1.4 Estrutura da Tese.....6

Capítulo 2 – Substâncias Séricas.....7

2.1 Fosfato inorgânico 8

2.1.1 Absorção – Distribuição - Excreção 10

2.2 Cálcio 11

2.2.1 Absorção – Distribuição - Excreção 11

2.2.2 Vitamina D 12

2.2.2.1 Efeito da Vitamina D sobre a Absorção de Cálcio 12

2.2.2.2 Efeito da Vitamina D sobre a Absorção de Fosfato Inorgânico..... 13

2.2.3 Calcitonina..... 13

2.2.4 Hormônio Paratireoidiano 14

2.2.4.1 Efeito do Hormônio Paratireoidiano na Absorção de Cálcio e Fosfato Inorgânico..... 14

2.2.4.2 Efeito do Hormônio Paratireoidiano na Excreção de Cálcio e Fosfato Inorgânico..... 16

2.3 Creatinina 16
2.3.1 Absorção – Distribuição - Excreção 16
2.4 Uréia 17
2.4.1 Absorção – Distribuição - Excreção 17
2.5 Conclusão 18

Capítulo 3 – Atuação das Substâncias Séricas nos Processos Fisiológicos da Contração Muscular 19

3.1 Enzimas 19
3.2 Adenosina Trifosfato (ATP) 23
3.3 Creatinina e a Contração Muscular 26
3.4 A Produção de Energia 28
3.4.1 Controle Metabólico e o Fluxo Sanguíneo 31
3.5 Conclusão 32

Capítulo 4 – A Contração Muscular e as Substâncias Séricas 33

4.1 Fibras Musculares (Sistema Muscular Esquelético) 34
4.1.1 Tipos de Fibras 39
4.1.2 Recrutamento das Fibras Musculares 42
4.1.3 Tipos de Contração Muscular 44
4.2 A Ação do Cálcio na Contração Muscular 45
4.3 A Ação do Fosfato Inorgânico na Contração Muscular 50
4.4 O Fosfato de Potássio 54
4.5 Conclusão 55

Capítulo 5 – Metodologia 56

5.1 Material e Método 56
5.1.1 Animais 56
5.1.2 Drogas e Reagentes 57
5.1.3 Grupos 58

5.2 Procedimentos 59
5.2.1 Administração da Droga 60
5.2.2 Técnica Cirúrgica 61
5.2.3 Análise Bioquímica da Creatinina, Uréia, Cálcio e Fosfato Inorgânico 63
5.2.4 Dosagem Bioquímica 63
5.2.4.1 Creatinina 64
5.2.4.2 Fosfato Inorgânico 65
5.2.4.3 Cálcio 67
5.2.4.4 Uréia 68
Capítulo 6 – Resultados 71
6.1 Material e Métodos 71
6.2 Análise dos Dados da Uréia 73
6.2.1 Teste de Normalidade 73
6.2.2 Teste de Homocedasticidade 74
6.3 Análise dos Dados da Creatinina 76
6.3.1 Teste de Normalidade 76
6.3.2 Teste de Homocedasticidade 77
6.4 Análise dos Dados da Fosfato Inorgânico 79
6.4.1 Teste de Normalidade 79
6.4.2 Teste de Homocedasticidade 80
6.5 Análise dos Dados da Cálcio 83
6.5.1 Teste de Normalidade 83
6.5.2 Teste de Homocedasticidade 84
6.6 Análise da Relação entre a Concentração Sérica do Fosfato Inorgânico e Cálcio 87
6.7 Conclusão 89
Capítulo 7 – Discussão 90
7.1 Conclusão 99
Capítulo 8 – Conclusão e Trabalhos Futuros 100

8.1 Conclusão Gerais 100
8.2 Estudos Futuros..... 103

Referências Bibliográficas 105

Anexo A 199

Anexo B 132

Lista de Figuras

Figura 3.1 Ligação peptídica [Adaptado de BERG et al., 2004, p. 180] 20

Figura 3.2 Especificidade enzimática. (A) A tripsina cliva no lado carboxílico de arginina e lisina, enquanto (B) a trombina cliva especificamente ligações Arg-Gli somente em certas sequências [Adaptado de BERG, 2004, p. 203] 20

Figura 3.3 Transferência de fosforila por nucleotídeo monofosfato cinases [Adaptado de BERG, 2004, p. 265] 22

Figura 3.4 Estruturas de ATP, ADP e AMP [Adaptado de BERG et al., 2004, p. 393]. 24

Figura 3.5 Estrutura da molécula de ATP, mostrando as ligações do fosfato de alta energia. Quando o terceiro fosfato da molécula de ATP é separado da adenosina pela ação da ATPase, a energia é liberada [Adaptado de FOSS, 2000 p. 20] 25

Figura 3.6 Catálise da fosfocreatina pela creatina quinase [Adaptado de WILMORE, 2001 p. 121] 26

Figura 3.7 Fontes de ATP durante a atividade física [Adaptado de BERG et al., 2004, p. 396] 27

Figura 4.1 Relação entre tecidos conjuntivos e a membrana celular do músculo esquelético [Modificado de FOSS, 2000 p. 122] 35

Figura 4.2 Fibras musculares e os tecidos conjuntivos [Alterado de WILMORE, 2001, p. 26] 35

Figura 4.3 Exemplo de um sarcômero (Unidade funcional básica de uma miofibrila) [Modificado de WILMORE, 2001 p. 32] 37

Figura 4.4 Representação de um retículo sarcoplasmático [Modificado de VILELA, 2005]..... 38

Figura 4.5 Esquema ilustrativo da análise histoquímica em secção transversal de um músculo para identificar a coloração da mATPase submetida a diferentes níveis de pH (a: pH=10,4; b: pH=4,3; c: pH=4,55). Neste exemplo, é possível determinar cinco tipos de fibras musculares (I, IIc, IIa, IIab e IIb) [Modificado de HOSTLER, ,2001, p. 114] 41

Figura 4.6 Propriedades funcionais da unidade motora. A - lenta, com alta resistência à fadiga; B - rápida, com moderada resistência à fadiga; C - rápida, com baixa resistência à fadiga [Adaptado de ROBERGS, 2002] 43

Figura 4.7 Os túbulos transversos e o retículo sarcoplasmático de uma fibra muscular [Adaptado de WILMORE et al., 2001, p. 30] 46

Figura 4.8 Filamentos de troponina e tropomiosina [Adaptado de SCOTT et al., 2001, p. 1812] 47

Figura 4.9 Divisão da miosina: meromiosina leve e meromiosina pesada [Adaptado de VOET et al., 2002, p. 182]..... 48

Figura 4.10 Seqüência de eventos que levam à ação muscular [Adaptado de WILMORE et al., 2001, p. 35] 49

Figura 4.11 Pontes cruzadas. Processo de ação do cálcio sobre a actina e a miosina [Adaptado de FOSS et al., 2000, p. 128]]..... 50

Figura 4.12 Diagrama esquemático do ciclo catalítico das ATPases. Destaque para a o resultado da hidrólise com a liberação dos íons Mg^{2+} e do fosfato inorgânico (Pi) [Modificado de KÜHLBRANDT, 2004, p. 291]..... 51

Figura 4.13 Figura esquemática que ilustra os locais onde o aumento do Pi pode afetar a função muscular durante a fadiga. O aumento do Pi pode agir diretamente na miofibrila e diminuir a produção de força das pontes

cruzadas e a sensibilidade das miofibrilas em relação ao Ca^{2+} (A). Agir sobre a liberação do Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (B). O aumento do Pi pode aumentar a tetania na contração muscular pelo: estímulo dos canais de liberação do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (1); inibição da captação de ATP do retículo sarcoplasmático (2); e, através da precipitação com Ca^{2+}, diminuir o Ca^{2+} disponível para liberação (3) [Adaptado de WESTERBLAD, 2002, p. 20]..... 53

Figura 5.1 Fotografia mostrando injeção pela via intraperitoneal, utilizado para a administração do soro fisiológico, do fosfato de potássio e do anestésico..... 61

Figura 5.2 Fotografia mostrando a abertura da cavidade abdominal, visando à retirada do sangue, através da veia cava inferior, para análise..... 61

Figura 5.3 Fotografia mostrando a veia cava inferior..... 62

Figura 5.4 Fotografia mostrando a retirada do sangue da veia cava inferior 62

Figura 5.5 Fotografia mostrando o teste colorimétrico *in vitro* para determinação de creatinina..... 65

Figura 5.6 Fotografia mostrando o teste colorimétrico *in vitro* para determinação de fosfato inorgânico..... 66

Figura 5.7 Fotografia mostrando o teste colorimétrico *in vitro* para determinação de cálcio..... 68

Figura 5.8 Fotografia mostrando o teste colorimétrico *in vitro* para determinação de uréia 69

Figura 6.1 Relação entre os níveis de fosfato inorgânico (mg/kg) e uréia (mg/dl) .. 75

Figura 6.2 Relação entre os níveis de fosfato inorgânico (mg/kg) e creatinina sérica (mg/dl) 76

Figura 6.3 Relação entre os níveis de fosfato inorgânico (mg/kg) e fosfato sérico (mg/dl) e a linha de tendência caracterizando um sigmoidal de quatro parâmetros 80

Figura 6.4 Relação entre os níveis de fosfato inorgânico (mg/kg) e cálcio sérico (md/dl) e a linha de tendência caracterizando um sigmoidal de quatro parâmetros 84

Figura 6.5 Diferença entre a dose de 0,0 mg/kg de fosfato inorgânico (controle) e a dose de 5,0 mg/kg, sobre cálcio sérico, e seus respectivos desvios padrão 87

Lista de Tabelas

Tabela 6.1 Representação dos Modelos Lineares e Não Lineares..... 73

Tabela 6.2 Freqüência dos valores de uréia observados e esperados, e resultado (D) do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) de aderência à distribuição normal, com indicação do nível de significância (p). 75

Tabela 6.3 Valores médios e desvios padrão de uréia, nas diferentes concentrações de fosfato inorgânico e teste de homocedasticidade de Hartley (F máximo), com indicação do nível de significância (p). 76

Tabela 6.4 Parâmetros dos modelos de regressão ajustados. 76

Tabela 6.5 Freqüência dos valores de creatinina observados e esperados, e resultado (D) do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) de aderência à distribuição normal, com indicação do nível de significância (p) 78

Tabela 6.6 Valores médios e desvios padrão de creatinina, nas diferentes concentrações de fosfato inorgânico e teste de homocedasticidade de Hartley (F máximo), com indicação do nível de significância (p) 79

Tabela 6.7 Parâmetros dos modelos de regressão ajustados. 79

Tabela 6.8 Freqüência dos valores de fosfato inorgânico observados e esperados, e resultado (D) do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) de aderência à distribuição normal, com indicação do nível de significância (p). 81

Tabela 6.9 Valores médios e desvios padrão de fosfato inorgânico, nas diferentes concentrações de fosfato inorgânico e teste de homocedasticidade de Hartley (F máximo), com indicação do nível de significância (p) 82

Tabela 6.10 Parâmetros dos modelos de regressão ajustados. 82

Tabela 6.11 Freqüência dos valores de cálcio observados e esperados, e resultado (D) do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) de aderência à distribuição normal, com indicação do nível de significância (p). 85

Tabela 6.12 Valores médios e desvios padrão de cálcio, nas diferentes concentrações de fosfato inorgânico e teste de homocedasticidade de Hartley (F máximo), com indicação do nível de significância (p) 86

Tabela 6.13 Parâmetros dos modelos de regressão ajustados. 86

Tabela 6.14 Comparação de médias de fosfato inorgânico sérico e cálcio sérico nas diferentes doses de fosfato inorgânico, com o teste de Tukey. 89

Anexo A

Tabela 1 Grupo I (Controle) segundo valores de uréia..... ...119

Tabela 2 Grupo I (Controle) segundo valores de creatinina..... 120

Tabela 3 Grupo I (Controle) segundo valores de fosfato inorgânico.....120

Tabela 4 Grupo I (Controle) segundo valores de cálcio 120

Tabela 5 Grupo II (K3PO4 - 0,5 mg/kg) segundo valores de uréia 121

Tabela 6 Grupo II (K3PO4 - 0,5 mg/kg) segundo valores de creatinina..... 121

Tabela 7 Grupo II (K3PO4 - 0,5 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico 122

Tabela 8 Grupo II (K3PO4 - 0,5 mg/kg) segundo valores de cálcio..... 122

Tabela 9 Grupo III (K3PO4 - 1,5 mg/kg) segundo valores de uréia 123

Tabela 10 Grupo III (K3PO4 - 1,5 mg/kg) segundo valores de creatinina..... 123

Tabela 11 Grupo III (K3PO4 - 1,5 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico124

Tabela 12 Grupo III (K3PO4 - 1,5 mg/kg) segundo valores de cálcio..... 124

Tabela 13 Grupo IV (K3PO4 - 2,5 mg/kg) segundo valores de uréia..... 125

Tabela 14 Grupo IV (K3PO4 - 2,5 mg/kg) segundo valores de creatinina 125

Tabela 15 Grupo IV (K3PO4 - 2,5 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico126

Tabela 16 Grupo IV (K3PO4 - 2,5 mg/kg) segundo valores de cálcio 126

Tabela 17 Grupo V (K3PO4 - 5 mg/kg) segundo valores de uréia 127

Tabela 18 Grupo V (K3PO4 - 5 mg/kg) segundo valores de creatinina.....127

Tabela 19 Grupo V (K3PO4 - 5 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico....128

Tabela 20 Grupo V (K3PO4 - 5 mg/kg) segundo valores de cálcio..... ...128

Tabela 21 Grupo VI (K3PO4 - 7,5 mg/kg) segundo valores de uréia..... 129

Tabela 22 Grupo VI (K3PO4 - 7,5 mg/kg) segundo valores de creatinina 129

Tabela 23 Grupo VI (K3PO4 - 7,5 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico130

Tabela 24 Grupo VI (K3PO4 - 7,5 mg/kg) segundo valores de cálcio 130

Tabela 25 Grupo VII (K3PO4 – 10,0 mg/kg) segundo valores de uréia..... 131

Tabela 26 Grupo VII (K3PO4 – 10,0 mg/kg) segundo valores de creatinina..... 131

Tabela 27 Grupo VII (K3PO4 – 10,0 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico..... 132

Tabela 28 Grupo VII (K3PO4 – 10,0 mg/kg) segundo valores de cálcio..... 132

Anexo B

Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA/ UFMG).....133

Lista de Abreviaturas

ADP Adenosine Diphosphate (Difosfato de Adenosina ou Adenosina Difosfato)

AMP Adenosine Monophosphate (Monofosfato de Adenosina)

ANOVA Analise of Variance (Análise de Variância)

ATP Adenosine Triphosphate (Trifosfato de Adenosina ou Adenosina Trifosfato)

ATPase Adenosinetriphosphatase (Adenosinatrifosfatase)

Cr Creatine (Creatina)

Ca^{2+} Ion Calcium (Íons Cálcio)

CaPi Calcium Phosphate (Fosfato de Cálcio)

CETEA Comitê de Ética em Experimental Animal

CK Creatine Kinase (Creatina Quinase)

Cl^- Ion Chlorite (Íons Cloro)

CT Calcitonin (Calcitonina)

CO_2 Carbon Dioxide (Dióxido de Carbono)

DNA Desoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)

E.P.M. Standard Error of the Mean (Erro Padrão Médio)

Fe^{2+} Ion Iron (Íons Ferro)

g Grams (Gramas)

H^+ Ion Hydrogen (Íons Hidrogênio)

K^+ Ion Potassium (Íons Potássio)

K_3PO_4 Potassium Phosphate (Fosfato de Potássio)

KS Kolmogorov-Smirnov

Mg^{2+} Ion Magnesium (Íon Magnésio)

mg/dl Miligrams/Decilitres (Miligramos/Decilitro)

ml Mililitres (Mililitros)

mmol/l Milimolar/Litre (Milimolar/Litro)

Mn^{2+} Ion Manganese (Íon Manganês)

MHC Myosin Heavy Chain (Cadeia Pesada da Miosina)

Na^+ Ion Sodium (Íons Sódio)

NAD Nicotinamidade-adenine dinucleotide (Dinucleotídeo de Nicotinamida-Adenina)

NAD^+ The Oxidized Form of NAD (Forma Oxidada do NAD)

NADH The Reduced Form of NAD (Forma Reduzida do NAD)

NMP Nucleoside Monophosphatase Kinase (Nucleosídeos Monofosfato Cinases)

PC Phosphocreatine (Fosfocreatina)

pH Potential Hydrogen (Potencial de Hidrogênio)

Pi Inorganic Phosphate (Fosfato Inorgânico)

PPi Pyrophosphate (Pirofosfato)

PTH Parathormone (Paratormônio)

R^2 Determination Coefficient (Coeficiente de Determinação)

RS Reticulum Sarcoplasmic (Retículo Sarcoplasmático)

RyR Ryanodine Receptor (Receptor de Rianodina)

TnC Troponin C (Troponina C)

TnI Troponin I (Troponina I)

TnT Troponin T (Troponina T)

Zn^+ Ion Zinc (Íons Zinco)

Resumo

TICIANELI, J. G. *Efeito da Administração do Fosfato de Potássio na Concentração Sérica de Cálcio em Ratos (in vivo)*, FEELT-UFU, Uberlândia, 2007, 133p.

O fosfato inorgânico está fortemente associado com a debilidade do mecanismo contrátil, devido à sua atratividade com os íons cálcio liberados pelo retículo sarcoplasmático e a formação do fosfato de cálcio. Os estudos experimentais relacionados ao efeito do fosfato inorgânico reagindo com os íons cálcio, geralmente são realizados *in vitro*, ou seja, com reações que poderiam omitir substâncias que interferem nas condições *in vivo* durante a contração muscular. Ainda é necessário observar se a alta concentração do fosfato inorgânico conduz a precipitação do fosfato de cálcio e se estas reações podem ser verificadas *in vivo*, assim como, apresentar uma metodologia que permita a sua reprodutibilidade para futuros projetos de pesquisa que possam associar se esta precipitação afeta, ou não, a contração muscular. Este trabalho tem como objetivo avaliar se o fosfato inorgânico, induzido através da injeção de fosfato de potássio em animais vivos, causa precipitação com o cálcio sérico, gerando o produto insolúvel denominado fosfato de cálcio e, qual quantidade ideal a ser injetada para que tal precipitação ocorra efetivamente. O protocolo utilizado nesse procedimento constou da utilização de injeção de fosfato de potássio, via intraperitoneal, em ratos *Wistar* separados aleatoriamente e distribuídos em sete grupos iguais de sete animais, onde o Grupo I foi denominado de controle e injetado 0,5 ml de soro fisiológico (NaCl

0,9%) e os Grupos II a VII com as seguintes doses, respectivamente: 0,5, 1,5, 2,5, 5,0, 7,5 g e 10,0 mg/kg. Após 10 minutos da injeção de fosfato de potássio, o sangue foi coletado da veia cava inferior e submetido a avaliação bioquímica da creatinina, uréia, cálcio e fosfato. Os resultados demonstraram que após à análise de regressão, nenhum dos modelos foi estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) para representar alguma variação de uréia e da creatinina em função das variações das doses de fosfato inorgânico. Em relação ao fosfato inorgânico, o modelo sigmoidal de quatro parâmetros apresenta um excelente grau de ajuste aos dados e com diferença estatisticamente significante entre as doses de fosfato de potássio ($p<0,0147$). O cálcio sérico apresentou diferença estatisticamente significante ($p<0,0069$) entre o tratamento controle e o tratamento que corresponde à aplicação de 5,0 mg/kg de fosfato potássio. A partir desse valor há uma tendência à estabilização da resposta apresentada, onde não encontramos diferenças estatisticamente significante entre as doses de fosfato de potássio. Com estes resultados podemos concluir que o fosfato de potássio é uma substância capaz de causar precipitação de cálcio sérico sem qualquer lesão nos animais e que a quantidade ideal de fosfato de potássio a ser injetada para aumento da concentração de fosfato inorgânico e diminuição do cálcio sérico é de 5,0 mg/kg, sendo que doses superiores ou inferiores não apresentam efeitos na concentração de cálcio sérico devido a sua precipitação com o fosfato inorgânico.

Palavras-chave:

fosfato inorgânico, íons cálcio, fosfato de cálcio, contração muscular

Abstract

TICIANELI, J. G. *Effect of the Administration of the Potassium Phosphate in the Calcium Serum Concentration in Rats (in vivo)*, FEELT-UFU, Uberlândia, 2007, 133p.

The evidences demonstrate that the inorganic phosphate increase is strongly associated with the weakness of the contractile mechanism, due to attractiveness with the ion calcium liberated by the sarcoplasmic reticulum and the formation of the calcium phosphate. Experimental studies related to the effect of the inorganic phosphate reacting with ion calcium, usually *in vitro* are accomplished, in other words, with reactions that could omit substances with interfere in the conditions *in vivo* during the muscular contraction. It is still necessary to observe the high concentration of inorganic phosphate drives the precipitation of calcium phosphate and if these reactions can be verified *in vivo*, as well as, to present a methodology that allows reproductibility for futures research projects that can associate this precipitation affects, or can not, the muscular contraction. This study order to evaluated the inorganic phosphate, induced through the injection of potassium phosphate *in vivo*, it causes precipitation with the calcium serum, generating the product denominated insoluble phosphate of calcium and, which ideal amount to be injected indeed for such a precipitation to happen *in vivo*. The protocol used in that procedure consisted of the use of intraperitoneal injection of potassium phosphate, in rats Wistar separated randon and equal distributed in seven groups of seven animals, where the Group I was denominated of control and injected 0,5 ml of physiologic solution (NaCl 0,9%) and the Groups II to VII with the following doses, respectively: 0,5, 1,5, 2,5, 5,0, 7,5 g e 10,0 mg/kg. After the injection of potassium

phosphate, the blood was collected of the inferior cava vein and submitted the biochemical evaluation of the creatinin, urea, calcium and inorganic phosphate. The results demonstrated that after to the regression of analysis, none of the models was significant statistically ($p \leq 0,05$) to represent some urea variation and of the creatinin in function of the variations of the doses of inorganic phosphate. In relation to the inorganic phosphate, the model sigmoidal of four parameters presents an excellent adjustment degree to the data and with difference significant statistically among the doses of potassium phosphate ($p < 0,0147$). The calcium serum presented difference significant statistically ($p < 0,0069$) among the treatment it controls and the treatment that corresponds to the application of 5,0 mg/kg of phosphate potassium. From of that value there is a tendency to the stabilization of the presented answer, where we didn't find differences significant statistically among the doses of potassium phosphate. With these results we can conclude that the potassium phosphate is a substance capable to cause precipitation of calcium serum without any lesion in the animals and that the ideal amount of potassium phosphate to be injected for increase of the concentration of inorganic phosphate and decrease of the calcium serum is of 5,0 mg/kg, and you dose superiors or inferior don't present effects in the concentration of calcium serum due to precipitation with the inorganic phosphate.

Keywords:

inorganic phosphate, ion calcium, calcium phosphate, muscular contraction

Capítulo 1

Introdução

Os músculos são órgãos ativos do movimento, possuem a capacidade de contrair e relaxar e transmitem movimentos aos ossos sobre os quais se inserem. Eles também são responsáveis pelo funcionamento de diversos órgãos internos como o tubo digestório, a bexiga, o útero, os vasos sanguíneos e outros que possuem ações importantes para manutenção das atividades vitais.

Através do mecanismo contrátil ocorrem ações digestórias, locomoção, funções cardíacas, movimentos oculares, fonação, deglutição, respiração, transporte de células sanguíneas, entre tantas outras e, por serem atividades que consideramos usuais, como pegar um copo, andar, subir ou descer uma escada, não imaginamos quantas reações químicas estão ocorrendo intrinsecamente para realização desta chamada simples ação.

Por isso mesmo, ao longo dos anos, inúmeros questionamentos, várias teorias e aplicações clínicas foram utilizadas para explicação dos mecanismos bioquímico, fisiológico e mecânico da contração muscular. Com o avanço das metodologias nas pesquisas científicas, muitas explicações estão emergindo para suprimir alguns questionamentos e preencher algumas lacunas sobre este processo.

Mesmo diante de avanços metodológicos, algumas questões ainda precisam ser respondidas, pois as contrações musculares são resultados dos processos bioquímicos que interferem nos processos fisiológicos de produção de movimento ou força. Estes processos necessitam ser discutidos e compreendidos. Definições precisam ser refeitas e

atualizadas, para assuntos tão polêmicos quanto, por exemplo, a fadiga e a dor muscular.

Os conhecimentos sobre as alterações metabólicas relacionadas à contração podem prevenir ou solucionar patologias como o infarto, mialgias, paralisias, distrofias entre outras. Ao longo dos anos, diversos pesquisadores de vários campos das ciências, estão detectando outras substâncias que influenciam diretamente no processo de contração muscular, assim como, ter permitido uma revisão sobre conceitos clássicos relacionados à análise da atividade muscular.

1.1 Motivação

Desde Berzelius em 1808, e sua descoberta de uma elevada concentração de ácido lático muscular; passando por Von Muralt em 1950, com as distinções das quatro diferentes etapas do desenvolvimento da química muscular: fase pré-lática, lática, fosforilação e miosina; até culminar em Fletcher e Hopkins em 1907, que praticamente deu início à era do ácido lático [BROOKS et al., 2001; GLADDEN, 2004], o músculo deixou, paulatinamente, de ser encarado apenas como uma massa de carne comandada pela vontade e assumiu funções de grande importância para o nosso metabolismo. Suas estruturas passaram a ser estudadas minuciosamente e setorialmente e, então, a serem encarados como fontes de produção de energia para as várias atividades, das mais simples as mais complexas.

Esta mudança de visão sobre a morfologia e a função muscular, só foi possível devido à evolução de várias áreas do conhecimento como a bioquímica, histologia, fisiologia e, atualmente, a tecnologia, que permite o fornecimento de informações mais confiáveis na inspeção, mensuração da força, avaliação de lesões, exames pré-clínicos, entre outras.

Sensações como o cansaço, falta de energia, incapacidade, fraqueza muscular, são bastante conhecidos, mas poucos conseguem supor os eventos bioquímicos que ocorrem dentro do campo da biologia molecular e que levam a uma debilidade muscular. Esta dificuldade de interpretação dificulta a definição dos processos fisiológicos associados com a deficiência do processo de contração muscular.

Ao longo dos anos, várias substâncias (ácido lático, íons hidrogênio - ion hydrogen - H^+, íons magnésio - ion magnesium - Mg^{2+}, íons sódio - ion sodium - Na^+, íons potássio - ion potassium - K^+, entre outros) foram relacionadas com os processos contráteis ou aos potenciais de ação. Atualmente, as evidências demonstram que o aumento do fosfato inorgânico (inorganic phosphate - Pi), está fortemente associado com a contração muscular [BOSE et al., 2003; HE et al., 2003; DEBOLD et al., 2004; HINKEN et al., 2004]. Isto decorre devido à sua atratividade com os íons cálcio (ion calcium - Ca^{2+}) liberado pelo retículo sarcoplasmático (reticulum sarcoplasmic - RS) e a formação do fosfato de cálcio (calcium phosphate - CaPi).

A contração de um músculo esquelético é iniciada por uma seqüência de potenciais de ação que se propagam no túbulo transverso causando despolarização e ativando canais de liberação na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático, denominados de receptores de rianodina (ryanodine receptor - RyR), no qual liberam íons cálcio para a ativação do mecanismo contrátil [BALOG et al., 1999; BERRIDGE et al., 2000; MACINTOSH, 2003].

A energia necessária para o processo, envolvendo uma unidade contrátil, é derivada da hidrólise da Adenosina Trifosfato (adenosine triphosphate - ATP), fazendo-a um item crucial para a contração muscular, devendo ser mantida em altos níveis. A rápida ressíntese da ATP, durante atividade aeróbica ou anaeróbica, é conseguida pela enzima creatina quinase (creatine kinase - CK) e a fosfocreatina (phosphocreatine - PC), os quais, também estão presentes em altas concentrações no músculo (40 mM) [FITTS, 1994; ALLEN et al., 1995].

Como a ATP é hidrolizada em Adenosina Difosfato (adenosine diphosphate - ADP) e Fosfato Inorgânico (Pi), a PC doa seu fosfato para a ADP para ressintetizar a ATP e assim a concentração de Pi, resultante das hidrólises dentro do citoplasma, pode alcançar níveis altos (30 mM) [BALOG et al., 2000; DAHLSTEDT et al., 2000; VAN DER VELDEN et al., 2001; TESI et al., 2002; DEBOLD, 2004; HINKEN et al., 2004].

O efeito inibitório do Pi sobre a ativação da força pelo Ca^{2+} na contração tem sido bastante estudado ao longo dos anos [BOSE et al., 2003; HE et al., 2003; DEBOLD et al., 2004; HINKEN et al., 2004], mas outros efeitos do Pi ainda devem ser esclarecidos.

Fryer et al. [1995] foi o primeiro a sugerir que o Pi pudesse entrar no retículo sarcoplasmático e precipitar o Ca^{2+}, formando uma substância insolúvel denominada fosfato de cálcio. Dessa maneira, reduzindo rapidamente a quantidade de íons cálcio liberada [ALLEN et al., 2001] e contribuindo com a fadiga muscular [ALLEN et al., 1995]. Evidentemente, o Pi pode entrar passivamente no retículo sarcoplasmático [POSTERINO et al., 1998], possivelmente por uma condutância dos canais de íons cloro (ion chlorite - Cl^-) que conduz Pi [LAVER et al., 2004].

Um possível questionamento sobre os resultados dos estudos anteriores, relacionados ao efeito do Pi reagindo com o Ca^{2+}, é que os estudos experimentais geralmente são realizados *in vitro*, ou seja, com reações que poderiam omitir substâncias que agem/interferem nas condições *in vivo* durante a contração muscular.

Omitindo estas reações metabólicas, poderemos considerar que os resultados são limitados em algumas regiões. Isto também foi observado por Fryer et al. [1995], onde considera que a omissão de algumas reações em alguns experimentos não permite demonstrar se a redução da força foi somente devido à precipitação de CaPi, dentro do retículo sarcoplasmático, ou pela perda de Ca^{2+} pelo RS. Isto ocorre porque o Pi citoplasmático também apresenta a probabilidade de aumentar a abertura de receptores de RyR existentes na bicamada lipídica, sugestionando que o Pi pode, também, causar a liberação de Ca^{2+} pelo RS através do receptor de rianodina [FRUENS et al., 1994; BALOG et al., 2000].

Atualmente, é desconhecido se as contrações tetânicas são afetadas por uma redução do Ca^{2+} devido à formação do CaPi dentro do RS [DUTKA et al., 2005]. É possível que a força muscular possa não ser afetada por uma redução significativa do Ca^{2+} disponível no RS, pois o conteúdo endógeno de cálcio dentro do RS Ca^{2+} (~ 1.1 mmol/l) pode ser bem maior do que o necessário para ativar completamente o aparelho contrátil [FRYER et al., 1996; OWEN et al., 1997]. Por outro lado, a presença de qualquer quantidade de CaPi dentro do RS poderia causar uma redução do potencial de ação induzido pela quantidade diminuta de Ca^{2+} [DUTKA et al., 2005].

Desta maneira, ainda é necessário observar se a alta concentração de Pi conduz a uma ligação química com o cálcio e se esta reação pode ser verificada *in vivo*, assim como, apresentar uma metodologia que permita a sua reprodutibilidade para futuros

projetos de pesquisa que possam associar se esta precipitação afeta, ou não, a contração muscular.

1.2 Hipótese

Nesta pesquisa, concebemos a hipótese de que o aumento da concentração sérica de fosfato inorgânico, induzida por diferentes doses de fosfato de potássio, poderia influenciar na concentração sérica de cálcio.

1.3 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo verificar se o fosfato inorgânico, induzido através da injeção de fosfato de potássio em animais vivos, causa precipitação com o cálcio sérico e, qual quantidade ideal a ser injetada para que tal precipitação ocorra efetivamente.

Uma das principais conseqüências deste estudo é fornecer uma padronização de um modelo experimental para avaliar a influência do fosfato inorgânico sobre a homeostasia do cálcio na contração muscular *in vivo*.

Para que possamos comprovar os nossos objetivos, as seguintes metas devem ser cumpridas:

- determinar a concentração de fosfato de potássio suficiente para induzir a formação do fosfato de cálcio;
- analisar a alteração do cálcio sérico em resposta a administração do fosfato de potássio em ratos (*in vivo*);

1.4 Estrutura da Tese

No decorrer dos capítulos desta tese, poderão ser observados os caminhos seguidos para o cumprimento das metas descritas, bem como do objetivo maior do trabalho. Estruturalmente, este texto está dividido da seguinte forma:

- Capítulo 1: apresentação da motivação, dos objetivos e da estrutura do trabalho;
- Capítulo 2: apresentação das substâncias séricas: fosfato inorgânico, cálcio, creatinina e uréia, concentrações, processo de absorção, distribuição e excreção e as suas associações com a contração muscular;
- Capítulo 3: apresentação da bioquímica celular, descrevendo sobre as enzimas, a ATP, a relação entre a creatinina e a contração muscular, os sistemas de produção de energia e o controle metabólico;
- Capítulo 4: faz-se uma apresentação das bases fisiológicas do processo de contração muscular e as estruturas envolvidas, como as fibras musculares e os tipos de contração, da relação do cálcio e do fosfato inorgânico com a contração muscular, assim como do processo de precipitação na formação do fosfato de cálcio;
- Capítulo 5: a apresentação do trabalho de forma detalhada, assim como as descrições metodológicas, os sujeitos da pesquisa, os equipamentos, o procedimento cirúrgico e os reagentes;
- Capítulo 6: apresentação dos resultados coletados da análise bioquímica da concentração sérica do cálcio, fosfato, uréia e creatinina;
- Capítulo 7: apresentação da discussão dos resultados;
- Capítulo 8: conclusões finais deste trabalho e sugestões para trabalhos futuros que possam ser realizados.

Capítulo 2

Substâncias Séricas

O sangue é um fluido que circula pelo coração, artérias, veias e capilares e que tem como função a manutenção da vida do organismo, através do transporte constante de nutrientes. Estes elementos nutritivos são constituídos de proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais, água e vitaminas. Possui também a função de transportar oxigênio para as células corporais e servir de meio para que elementos de excreção possam ser eliminados adequadamente.

O sangue é composto de uma parte líquida, denominada plasma e de elementos figurados que são os glóbulos sanguíneos e as plaquetas. O plasma sanguíneo é composto de 90% de água e 10% de solutos. Nele está dissolvido, ou suspenso, uma grande variedade de proteínas, lipoproteínas, nutrientes, metabólitos, produtos residuais, íons orgânicos, íons inorgânicos e hormônios. Os glóbulos sanguíneos se dividem em hemáceas (eritrócitos), células anucleadas contendo hemoglobina e leucócitos, células nucleadas responsáveis pela defesa orgânica, sendo formada pelos neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. As plaquetas ou megacarióticos são fragmentos citoplasmáticos de células da medula óssea implicadas diretamente no processo de coagulação sanguínea.

Os íons e solutos no plasma sanguíneo são componentes não fixos, pois estão em constante fluxo entre o sangue e os vários tecidos. A captação de íons inorgânicos da dieta é, em geral, contrabalançada pela excreção da urina.

Para muito dos componentes do sangue, quando um equilíbrio estacionário é alcançado, a concentração dos componentes varia pouco, embora ocorra um fluxo contínuo do trato intestinal, sangue e urina. Uma grande variação nos níveis séricos dos íons inorgânicos pode resultar em doença grave ou morte. Dessa maneira, os rins desempenham um papel essencial para a manutenção do equilíbrio iônico, servindo como filtro seletivo que permite que os produtos residuais e o excesso de íons passem do sangue para a urina, enquanto evita a perda de nutrientes essenciais e dos íons [VAN DER VELDEN et al., 2001].

No sangue, vários íons inorgânicos como Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+}, Cl^{-}, íons zinco (ion zinc - Zn^{+}), íons ferro (ion iron - Fe^{2+}), íons manganês (ion manganese - Mn^{2+}), entre outros, são importantes para o metabolismo e, neste trabalho, destacaremos o fosfato inorgânico, o cálcio e as substâncias séricas: creatinina e a uréia.

A análise bioquímica do fosfato inorgânico e do cálcio teve como objetivo verificar se o aumento da concentração sérica do fosfato inorgânico estava relacionado com a diminuição da concentração sérica do cálcio, pois para o processo de contração muscular, que será especificado nos próximos capítulos, estes íons terão influência fisiológica.

A análise bioquímica da uréia e da creatinina sérica teve como objetivo verificar a integridade metabólica, pois as alterações nesses parâmetros são indicadores diretos do funcionamento normal do sistema urinário e do metabolismo protéico que poderiam diretamente influenciar os resultados desse trabalho. O aumento na concentração de uréia e da creatinina no plasma é indicador de uma variedade de doenças renais, com diferentes lesões glomerular, tubular ou vascular [GRANOUILET et al., 1996].

2.1 Fosfato Inorgânico

O fosfato inorgânico (Pi) é um nutriente essencial no metabolismo celular e mineralização do esqueleto. O organismo de um adulto contém de 500 a 600 g de

fósforo (medido como fosfato inorgânico) amplamente distribuído. É o sexto elemento mais abundante e o principal ânion do meio intracelular, sendo os seus papéis biológicos vinculados à (1) resistência estrutural do osso quando está associado ao cálcio na forma de hidroxiapatita; (2) atuação como agente essencial no metabolismo energético (em ligações fosfato de alta energia) e no metabolismo dos carboidratos e gorduras; (3) regulação da atividade de algumas enzimas; e (4) regulação do transporte do oxigênio através do 2,3-difosfoglicerato eritrocitário [VAN DER VELDEN et al., 2001].

Para realizar as funções descritas acima, os sistemas de transporte evoluíram para permitir a transferência eficiente dos ânions de Pi através da membrana. O Pi ingerido é absorvido pelo intestino, depositado no osso e filtrado pelo rim, onde é reabsorvido ou excretado em quantidades determinadas pelas exigências específicas do organismo. O rim é o maior regulador da homeostase do Pi e pode aumentar ou diminuir sua capacidade de reabsorção de acordo com as necessidades [TENENHOUSE, 2007].

As reações de transferência de fosfato, enzimaticamente catalizadas, são numerosas e vitais no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Ele atua em todas as células, tecidos e órgãos porque faz parte da constituição das membranas celulares e das organelas na forma de fosfolipídeos. Nas hemácias tem formação no 2-3 difosfoglicerato e, finalmente, compõe a adenosina trifosfato, um nucleotídeo que participa de todas as reações bioquímicas dependentes de energia [BOSE et al., 2003].

O Pi desempenha papel importante no metabolismo do cálcio e nas reações do equilíbrio ácido-básico por fazer parte de um importante sistema tampão. Nos ossos, desempenha funções cruciais no desempenho das atividades osteoblástica e osteoclástica. Sais de fosfato são importantes tampões do fluido intracelular e nos rins desempenham importante função na excreção dos íons hidrogênio [BARTHEL et al., 2007].

No líquido extracelular e no potencial de hidrogênio (potential hydrogen – pH) fisiológico, a maior parte do fosfato inorgânico se apresenta na forma inorgânica monovalente ($H_2PO^-_4$, diidrogenofosfato) e divalente (HPO^{2-}_4, hidrogenofosfato). As quantidades relativas dos dois íons fosfato são dependentes do pH. Em pH 7,4, o coeficiente de diidrogeno fosfato/hidrogenofosfato é de 4:1. Devido ao efeito do pH

sobre as concentrações relativas das duas espécies de fosfato, o fosfato inorgânico sérico deve ser expresso em mg/dL [GRANOUILET et al., 1996].

A concentração sérica de fosfato inorgânico no adulto normal varia de 2,7 a 4,5 mg/dL (0,9 a 1,5 mEq/l) e na criança de 4,0 a 7,1 mg/dL (1,3 a 2,3 mEq/l). Mais da metade deste fosfato inorgânico se encontra na forma ionizada, estando o restante precipitado com o cálcio, sódio, magnésio (37%) e com as proteínas plasmáticas (5 a 10%) [HENRY, 1999; TENENHOUSE, 2007].

2.1.1 Absorção – Distribuição - Excreção

A concentração de fosfato inorgânico é regulada pelos túbulos renais onde apresentam transporte máximo normal para a absorção de cerca de 0,1 mmol/min. Dessa maneira, uma quantidade menor de Pi será reabsorvida e uma quantidade maior será excretada [LAROCHE, 2001]. A absorção do Pi está vinculada com as condições de aumento das necessidades que ocorrem durante o crescimento da criança, na gravidez e na lactação. O meio ácido do estômago (pH: 2) e da maior parte do intestino delgado (pH: 8) desempenha importante papel na solubilidade e biodisponibilidade do fosfato inorgânico, pois, somente são absorvidos os sais solúveis. Quando o pH está elevado, formam-se sais insolúveis de fosfato inorgânico que são eliminados pelas fezes [HENRY, 1999].

A maior parte do fosfato inorgânico absorvido a partir do intestino do adulto é excretada na urina. Isto é equivalente a aproximadamente de 0,35 a 1,0g do fosfato inorgânico diário.

A absorção intestinal é feita por transporte ativo e a presença de grandes quantidades de cálcio ou alumínio promove a formação de fosfato insolúvel que é excretado nas fezes. A vitamina D estimula diretamente a absorção intestinal, sendo que a concentração de fosfato inorgânico no plasma é inversamente relacionada com a atividade da vitamina D, ou seja, quanto maior for a sua atividade, menor é a concentração de fosfato inorgânico no plasma.

A redução de fosfato inorgânico no sangue promove um aumento na concentração de cálcio sérico, o que dificulta a deposição de sais de cálcio nos ossos e um aumento de Pi no sangue facilita a deposição óssea do cálcio [TENENHOUSE, 2007].

2.2 Cálcio

O cálcio é o quinto elemento mineral mais abundante do corpo humano. Aproximadamente, 98% dos 1.000 a 1.200 gramas de cálcio no adulto estão no esqueleto e o restante está presente no líquido extracelular e nos tecidos, principalmente nos músculos esqueléticos [BERRIDGE et al., 2003]. Tem um papel vital nos processos fisiológicos básicos como a coagulação sanguínea, condução neuromuscular, na excitabilidade do músculo esquelético e cardíaco, na síntese glandular, na regulação das glândulas exócrinas e endócrinas, na preservação da integridade da membrana celular e na permeabilidade dos íons sódio e potássio.

No sangue, o cálcio está presente no plasma, sendo o seu gradiente extracelular a intracelular da ordem de 10^4:1. A concentração intracelular baixa é mantida pela bomba iônica e pelo seu mecanismo de troca. A calmodulina, um receptor de cálcio intracelular, tem um importante papel no processo de manutenção da concentração intra e extracelular [MORIMOTO et al., 1997].

Fora da célula, o cálcio sérico está mantido dentro de uma faixa estreita de aproximadamente 9,0 a 10,0 mg/dL. No soro, o cálcio existe de três formas distintas: (1) cálcio livre e ionizado, que é a forma fisiologicamente ativa e responsável por aproximadamente 50% do cálcio total; (2) cerca de 5% está precipitado com uma variedade de ânions e (3) 45% restante estão ligados as proteínas plasmáticas, como a albumina e a globulina [GRANOUILET et al., 1996].

As distribuições relativas das três formas são alteradas como resultado da mudança de pH dos fluídos extracelulares, sendo que o meio ácido promove um aumento do cálcio ionizado e a alcalose promove um declínio na concentração.

2.2.1 Absorção – Distribuição - Excreção

O cálcio é absorvido por um processo de transporte ativo que ocorre no duodeno e no jejuno superior. O maior estímulo de absorção é a vitamina D. A absorção é aumentada pelo hormônio do crescimento, pelo meio ácido dos intestinos e pela dieta aumentada de proteínas.

A estimativa de excreção diária de cálcio pela transpiração varia amplamente de 15 mg a mais de 100 mg. A perda pode exceder este limite durante condições ambientais extremas. A maior perda líquida de cálcio é pela excreção urinária que corresponde de 50 a 200 mg por dia, dependendo do consumo diário na alimentação. A excreção do cálcio urinário é aumentada por hipercalcemia, carência de fosfato, acidose e glicocorticóides. A excreção urinária é diminuída pelo hormônio paratireoidiano e certos diuréticos [BERRIDGE et al., 2000; MULLER et al., 2004].

A manutenção da homeostase do cálcio envolve a participação do intestino delgado, dos rins e do esqueleto, sendo regulada por vários hormônios envolvidos no metabolismo do cálcio, dentre eles o hormônio paratireoidiano, o hormônio derivado no metabolismo renal de vitamina D_3, o 1,25 – didroxicolecalciferol e a calcitonina [CAMPBELL, 2005; BARTHEL et al., 2007].

2.2.2 Vitamina D

A vitamina D é uma designação genérica para um grupo de esteróides estruturalmente semelhantes e solúveis em gordura, vários dos quais são vitalmente importantes no metabolismo do cálcio e do fosfato inorgânico. Alguns destes esteróides são denominados como pró-vitaminas, porque podem se transformar em compostos fisiologicamente ativos pela irradiação com luz ultra-violeta.

As duas vitaminas mais importantes são a vitamina D_2, ou ergosterol, e a vitamina D_3 ou colicalciferol. Aproximadamente 94% das vitaminas D_2 e D_3 no plasma estão ligadas a uma globulina sérica alfa. O excesso de vitamina D pode ser armazenado nos tecidos, metabolizada em produtos inativos ou excretada na bile [BARTHEL et al., 2007].

2.2.2.1 Efeito da Vitamina D sobre Absorção de Cálcio

A vitamina D contribui significativamente para a absorção de cálcio pelo tubo intestinal, assim como, para a deposição e reabsorção óssea. Para realizar esta função, a vitamina D deve, inicialmente, ser convertida no produto final ativo 1,25-diidroxicolecalciferol, também denominado $1,25(OH)_2$-D_3, através de uma série de reações no fígado e no rim [HALHALI et al., 2007].

O 1,25-diidroxicolecalciferol funciona como um hormônio promovendo a absorção intestinal de cálcio. Exerce este efeito ao aumentar, durante um período de 2 dias, a formação da proteína de ligação nas células epiteliais intestinais. Esta proteína atua na borda em escova das células epiteliais intestinais, transportando cálcio para o interior do citoplasma. A velocidade de absorção é diretamente proporcional à quantidade dessa proteína de ligação [BARTHEL et al., 2007].

A proteína de ligação permanece nas células durante várias semanas após a remoção do 1,25-diidroxicolecalciferol do organismo, causando um efeito prolongado sobre a absorção de cálcio [VAN DE GRAAF et al., 2004].

2.2.2.2 Efeito da Vitamina D sobre Absorção de Fosfato Inorgânico

A ação da vitamina D sobre o fosfato inorgânico está relacionada pelo aumento do fluxo através do epitélio gastrointestinal. Esta ação pode ocorrer por efeito direto ou indireto do 1,25-diidroxicolecalciferol, através da ação desse hormônio sobre a absorção de cálcio, que atua, por sua vez, como mediador do transporte do fosfato inorgânico [BARTHEL et al., 2007].

2.2.3 Calcitonina

A calcitonina (calcitonin - CT) é um hormônio peptídico produzido e secretado por células C especializadas (células parafoliculares) nos lobos laterais da glândula tireóide [LAMPRECHT et al., 2004].

A CT atua na redução das concentrações plasmáticas de cálcio por duas maneiras distintas: (1) o efeito imediato consiste em diminuir a atividade absortiva dos

osteoclastos e, provavelmente, também o efeito osteolítico em todo osso, com o conseqüente desvio do equilíbrio em favor da deposição de cálcio no compartimento rapidamente permutável de sais de cálcio do osso; (2) um efeito mais prolongado consiste em diminuir a formação de novos osteoclastos. Além disso, como a reabsorção osteoclástica do osso leva secundariamente à atividade osteoblástica, a diminuição do número de osteoclastos é seguida por números diminuídos de osteoblastos [YAMAGUCHI, 2000; IKEGAME et al., 2004].

A calcitonina também exerce efeitos menores sobre o processamento do cálcio nos túbulos renais e no tubo intestinal, possuindo, neste caso, efeitos opostos aos hormônios paratireóideos, que tem como função fisiológica de regular a concentração do cálcio ionizado sérico através do controle da absorção e excreção.

A CT exerce um efeito muito fraco sobre a concentração plasmática de cálcio no adulto. Existem duas razões para isso. Em primeiro lugar, qualquer redução inicial da concentração de íons cálcio causada pela calcitonina leva, dentro de poucas horas, a um estímulo da secreção de hormônios paratireóideos que sobrepuja quase por completo o efeito da calcitonina; em segundo lugar, no adulto, a velocidade diária de absorção e de deposição de cálcio é muito pequena, e até mesmo quando a velocidade de absorção é reduzida e a deposição é aumentada pela calcitonina, o efeito observado continua sendo muito pequeno sobre a concentração plasmática de íons cálcio [MUFFA et al., 2004].

2.2.4 Hormônio Paratireoidiano

O hormônio Paratireoidiano (parathormone - PTH) é secretado primariamente como uma cadeia simples de polipeptídios formada de 84 aminoácidos. Ele é derivado de um precursor maior demanda Pré - Pro PTH, de 115 aminoácidos, que é submetido a duas divisões sucessivas, ambas na seqüência amino terminal, resultando primeiro em um precursor, o ProPTH e depois no próprio hormônio [CAMPBELL, 2005].

A função fisiológica primária do PTH é regular a concentração do cálcio ionizada nos fluidos extracelulares. A secreção do PTH causa uma elevação na concentração do cálcio ionizado sérico e uma queda na concentração de fosfato inorgânico, através do controle da absorção e excreção do cálcio nos túbulos renais e no tubo digestório.

2.2.4.1 Efeito do Hormônio Paratireoidiano na Absorção de Cálcio e Fosfato Inorgânico

O efeito mais conhecido do PTH é a reabsorção óssea para restaurar a concentração de cálcio no fluido extracelular. A reabsorção óssea induzida pelo PTH é mediada pela atividade aumentada dos osteoclastos. A conversão aumentada das células osteoprogenitoras em osteoclastos ocorre como conseqüência de estímulos mais prolongados do PTH.

Os efeitos adicionais do PTH no osso são a formação elevada da colagenase, que degrada a matriz óssea e a degradação elevada da substância básica no osso. O resultado final da ação do PTH no osso é uma reabsorção verdadeira do osso e não simplesmente a desmineralização [CAMPBELL, 2005].

Nos rins, o PTH estimula as reabsorções de sódio, fosfato inorgânico, cálcio e íons de bicarbonato nos túbulos proximais e a reabsorção de cálcio no túbulo distal. O efeito líquido é uma elevação na concentração do cálcio sérico, fosfatúria e acidose metabólica leve. A ação do PTH no rim e no osso é mediada através da estimulação da atividade da adenilciclase. Estes efeitos controlam mudanças no transporte de cálcio e fosfato inorgânico nos rins e nos ossos.

O efeito do PTH na absorção intestinal de cálcio é indireto. O PTH estimula a síntese renal do metabolismo ativo da vitamina D, 1,25-$(OH)_2D_3$, o qual, por sua vez age como um regulador da absorção intestinal de cálcio [BARTHEL et al., 2007].

O hormônio paratireóideo exerce dois efeitos distintos sobre o osso no sentido de determinar a absorção de cálcio e de fosfato inorgânico. Um deles consiste numa fase muito rápida, que ocorre em minutos e resulta da ativação das células ósseas já existentes de modo a promover a absorção de cálcio e de fosfato inorgânico. A segunda fase é muito mais lenta e necessita de vários dias ou até mesmo semanas para instalar-se por completo, resultando na proliferação dos osteoclastos, seguida por aumento pronunciado de reabsorção osteoclástica do próprio osso e não apenas da absorção de sais de fosfato de cálcio do osso [CAMPBELL, 2005].

Para a absorção do cálcio, o PTH possui proteínas receptoras nas membranas celulares dos osteoblastos e dos osteócitos. O hormônio tem capacidade de ativar a bomba de cálcio, causando, portanto, a remoção rápida dos sais de fosfato de cálcio dos

cristais ósseos amorfos que se localizam próximo às células. O PTH estimula a bomba, aumentando a permeabilidade do lado da membrana osteocítica voltada para o líquido ósseo, permitindo, assim, a difusão de íons cálcio do líquido ósseo para as células da membrana [ARMBRECHT et al., 2007].

2.2.4.2 Efeito do Hormônio Paratireoidiano na Excreção de Cálcio e Fosfato Inorgânico

A administração de hormônio paratireóideo provoca perda rápida e imediata de fosfato inorgânico na urina, devido à redução da reabsorção tubular proximal de íons fosfato.

O hormônio paratireóideo aumenta a reabsorção tubular de cálcio, ao mesmo tempo em que diminui a reabsorção de fosfato inorgânico. Além disso, também aumenta a velocidade de reabsorção dos íons magnésio e íons hidrogênios, enquanto diminui a reabsorção de íons sódio, potássio e aminoácidos da mesma forma que afeta o fosfato inorgânico [MAITI et al., 2007].

Não fosse pelo efeito do hormônio paratireóideo sobre os rins, no sentido de aumentar a reabsorção de cálcio, a perda contínua de cálcio na urina levaria eventualmente à depleção desse mineral nos ossos.

2.3 Creatinina

A creatinina é um anidrido derivado da creatina. A creatina é sintetizada nos rins, fígado e pâncreas e, a seguir, é transportada pelo sangue a outros tecidos e órgãos, como músculos e cérebro onde é fosforilada a fosfocreatina. A interconversão entre fosfocreatina e creatina é uma característica do processo metabólico da contração muscular [MENDELSSOHN et al., 1999].

2.3.1 Absorção – Distribuição - Excreção

Entre 1% e 2% da creatina muscular são transformados por dia em creatinina, sendo que esta concentração de creatinina endógena produzida é proporcional a massa muscular e a atividade física, variando com a idade e o sexo. A excreção diária de creatinina pode ser 10% a 30% maior como resultado da alimentação [GRANOUILET et al., 1996].

A taxa de excreção em qualquer pessoa, na ausência de doença renal, é relativamente constante e está correlacionada com a produção endógena. A maior parte das variações interindividuais da excreção de creatinina é atribuída essencialmente à idade, ao sexo e à massa corporal magra.

Diferentemente da uréia, a creatinina praticamente não é reabsorvida, sendo que, praticamente, toda a creatinina filtrada pela estrutura glomerular passa pelo sistema tubular e é excretada pela urina [UCHIDA et al., 2002].

2.4 Uréia

A uréia é o principal produto metabólico nitrogenado do catabolismo protéico nos seres humanos, responsável por mais de 75% do nitrogênio não-proteico excretado. A biossíntese da uréia, a partir da amônia derivada do nitrogênio amínico, é executada exclusivamente por enzimas hepáticas do ciclo da uréia [CORREIA et al., 2005].

O organismo forma diariamente, em média, 25 a 30g de uréia, podendo ser atingida uma quantidade ainda maior em pessoas com dieta muito rica em proteínas e menor nas pessoas que adotam dietas em baixo teor protéico [GRANOUILET et al., 1996].

2.4.1 Absorção – Distribuição - Excreção

Na condição fisiológica, a uréia será reabsorvida passivamente pelos túbulos renais, pois devido ao seu tamanho diminuto, quando a água é reabsorvida, cerca de

metade da uréia do filtrado glomerular sofre reabsorção passiva ao se difundir junto com a água, enquanto que o restante passa para a urina.

A maior parte da uréia é excretada pelos rins, sendo que o restante ocorre através de perdas do aparelho gastrointestinal e da pele. Num rim normal, 40 a 70% da uréia altamente difusível, movem-se passivamente para fora do túbulo renal e para dentro do interstício, reentrando no plasma [NAGAYA et al., 2006].

Os dois fatores principais que determinam a velocidade de excreção da uréia são: (1) a concentração plasmática de uréia e (2) a intensidade da filtração glomerular. Esses fatores aumentam a excreção de uréia, principalmente pelo fato do volume de uréia que penetra nos túbulos proximais é igual ao produto da concentração plasmática de uréia pela intensidade de filtração glomerular. Em geral, a quantidade de uréia que passa pelos túbulos para a urina corresponde, em média, de 40 a 60% da carga de uréia que penetra nos túbulos proximais, sendo esta concentração diminuída quando a função renal encontra-se irregular [LASKOW et al., 1990; CORREIA et al., 2005].

2.5 Conclusão

Neste capítulo, apresentamos algumas substâncias que influenciam na contração muscular.

Estas substâncias, em especial neste trabalho, a creatinina, o cálcio, a uréia e o fosfato inorgânico, possuem várias funções no metabolismo orgânico e no processo de contração muscular.

Nos próximos capítulos iremos abordar algumas reações fisiológicas onde as substâncias acima estão atuando, como: a clivagem da ATP e a ação da creatinina e do cálcio na contração muscular.

Capítulo 3

Atuação das Substâncias Séricas nos Processos Fisiológicos da Contração Muscular

O processo de contração muscular vai além da visão macroscópica, cinética, clínica ou patológica do processo. O entendimento da contração muscular passa pela compreensão bioquímica das substâncias que estão direta ou indiretamente envolvidas no processo metabólico de produção de energia e da contração muscular.

3.1 Enzimas

As enzimas são fundamentais nos processos fisiológicos, pois catalisam todas as reações metabólicas e capacitam aos organismos à construção de outras moléculas, como as proteínas, ácidos nucléicos, carboidratos e lipídios que são necessárias para a vida [WEBB, 1993; TIPTON et al., 2000].

As enzimas pertencem à classe dos peptídeos, pois são formadas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas (Figura 3.1). Uma ligação peptídica é a união do grupo amino ($-NH_2$) de um aminoácido com o grupo carboxila (-COOH) de outro aminoácido, através da formação de uma amida [WEBB, 1993].

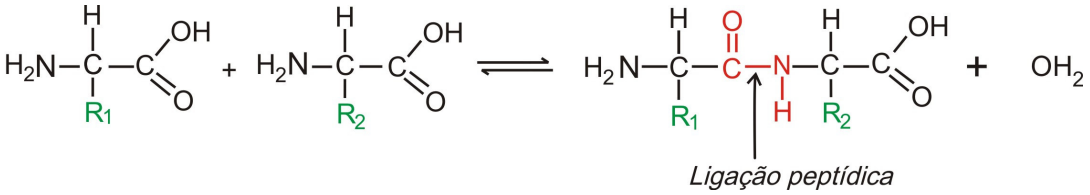

Figura 3.1 *– Ligação peptídica [Adaptado de BERG et al., 2004, p. 180].*

As enzimas, catalizadores dos sistemas biológicos, são notáveis dispositivos moleculares que determinam o perfil das transformações químicas, assim como do processo de transformação de uma energia em outra. As características fundamentais de uma enzima são o seu poder catalítico e a sua especificidade. Na ausência das enzimas, a maioria das reações químicas não aconteceria ou ocorreriam em velocidades menores. Dessa maneira, as atividades metabólicas das células não funcionariam sem as enzimas, inviabilizando a vida como conhecemos hoje [GALPERIN et al., 1998].

Uma enzima geralmente cataliza somente uma reação química ou um conjunto de reações estritamente relacionadas [HOCHACHKA, 1999]. Conforme demonstrado na Figura 3.2, onde a enzima tripsina cliva especificamente com as ligações arginina lisina, enquanto a trombina cliva especificamente as ligações arginina glicina, demonstrando a seletividade enzimática.

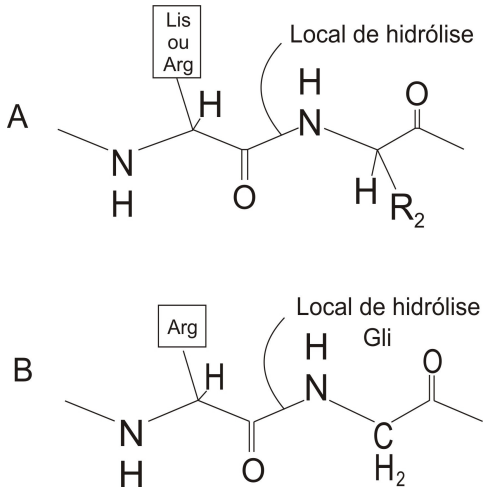

Figura 3.2 *– Especificidade enzimática. (A) A tripsina cliva no lado carboxílico de arginina e lisina, enquanto (B) a trombina cliva especificamente ligações Arg-Gli somente em certas seqüências [Adaptado de BERG et al., 2004, p. 203].*

As atividades catalíticas de muitas reações enzimáticas dependem da presença de pequenas moléculas denominadas co-fatores. Os co-fatores podem ser subdivididos em dois grupos: metais e moléculas orgânicas pequenas. Os co-fatores são na maioria íons inorgânicos, podendo também ser moléculas orgânicas, necessárias à ativação das enzimas. Sem o co-fator, as enzimas são inativas [PALMER et al., 1992; LO CONTE et al., 2000].

É importante observar que as enzimas são importantes catalizadores e com esta capacidade podem acelerar a velocidade de reações químicas para frente e também a reversão do processo, mas não tem a capacidade de alterar o produto, ou seja, as reações poderiam levar um tempo considerável para se chegar a um equilíbrio sem a presença de enzimas adequadas [GEGENHEIMER, 2000].

O estudo da atividade enzimática é importante no entendimento da ação muscular, pois toda contração passa inevitavelmente por reações químicas, por uma atividade onde uma substância ou substrato precisa se aderir a outra para formar um novo produto ou para produzir energia. Quando descrevemos sobre energia, estamos comentando sobre a principal atividade enzimática do organismo, pois a maioria das reações químicas existentes no processo energético corresponde à transferência de um grupamento funcional, tal como o fosfato ou amônia, de um substrato para outro [TIPTON et al., 2000].

As reações químicas de produção de energia possuem uma atividade metabólica muito alta e, mesmo em repouso, necessitam de uma grande quantidade de substratos para a realização do processo.

É importante compreendermos que algumas substâncias, condições de temperatura ou alterações do pH, podem inibir as atividades enzimáticas, desta maneira, diminuindo consideravelmente o processo químico.

As atividades de muitas enzimas podem ser inibidas pela ligação a pequenas moléculas e íons específicos. Este modo de inibir a atividade enzimática serve como um dos principais mecanismos de controle de sistemas biológicos. Muitos medicamentos e agentes tóxicos agem inibindo enzimas [LÖW et al., 2000].

A inibição enzimática pode influenciar o processo de contração muscular, pois esta inibição pode estar associada à ausência de fosforilação para a produção de energia,

principalmente devido à presença de algumas substâncias nocivas formadas pelo metabolismo muscular e que podem aderir ao centro ativo de enzimas específicas, inibindo ou diminuindo o processo de glicólise ou a transferência de fosfato para a produção da ATP. Esta inibição deve ser levada em consideração, pois pode comprometer imensamente o resultado de uma pesquisa ou de uma avaliação clínica, se o voluntário/paciente estiver fazendo uso de algum medicamento que possa influenciar a atividade enzimática [PANENIC et al., 1999].

No processo energético, as enzimas nucleosídeos monofosfato cinases (nucleoside monophosphatase kinase - NMP) possuem importante função, pois catalisam a transferência do fosfato terminal de um nucleotídeo trifosfato, geralmente ATP, para a fosforila de um nucleosídeo monofosfato. Estas enzimas empregam a catálise por íon metálico mas, neste caso, o metal forma um complexo com o substrato para acentuar a interação da enzima com o substrato [PALMER et al., 1992] (Figura 3.3).

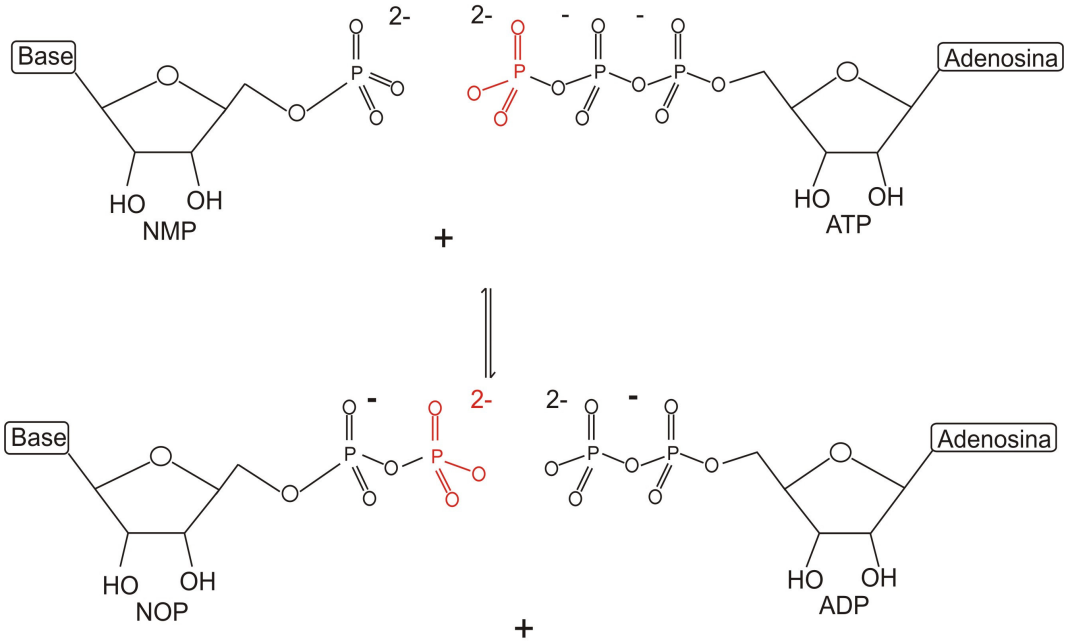

Figura 3.3 *– Transferência de fosforila por nucleotídeo monofosfato cinases [Adaptado de BERG et al., 2004, p. 265].*

Estudos cinéticos das NMP revelam que estas enzimas são essencialmente inativas na ausência de íons metálicos divalentes, tais como o magnésio (Mg^{2+}) ou o manganês (Mn^{2+}), mas se tornam ativas com a adição destes íons. Os nucleotídeos,

como a ATP, se ligam a estes íons, e o complexo do nucleotídeo com o íon metálico é o real substrato para as enzimas, aumentando a energia de ligação [HOCHACHKA, 1999].

3.2 Adenosina Trifosfato (ATP)

A Adenosina Trifosfato é um nucleotídeo responsável pelo armazenamento de energia em suas ligações químicas. É constituída de adenina, uma base nitrogenada e uma unidade trifosfato, cujas ligações permanecem estáveis, mas, quando são rompidas, é liberada uma grande quantidade de energia que pode ser utilizada por diversos processos biológicos, tais como o transporte ativo de moléculas, síntese e secreção de substâncias, locomoção, divisão celular, entre outros [MOTTA, 2003].

A ATP armazena energia proveniente da respiração celular e a principal forma de produção é a fosforilação oxidativa, onde um radical fosfato inorgânico (Pi) é adicionado a uma molécula de adenosina difosfato (ADP) ou a adenosina monofosfato (adenosine monophosphate - AMP) e pirofosfato (pyrophosphate - PPi), utilizando energia proveniente da decomposição da glicose [CAMPBELL-O'SULLIVAN et al., 2002] (Figura 3.4).

Para se tornar ativa, a ATP necessita de um metal, geralmente um complexo de ATP com íons magnésio ou manganês [DAHLSTEDT et al., 2001].

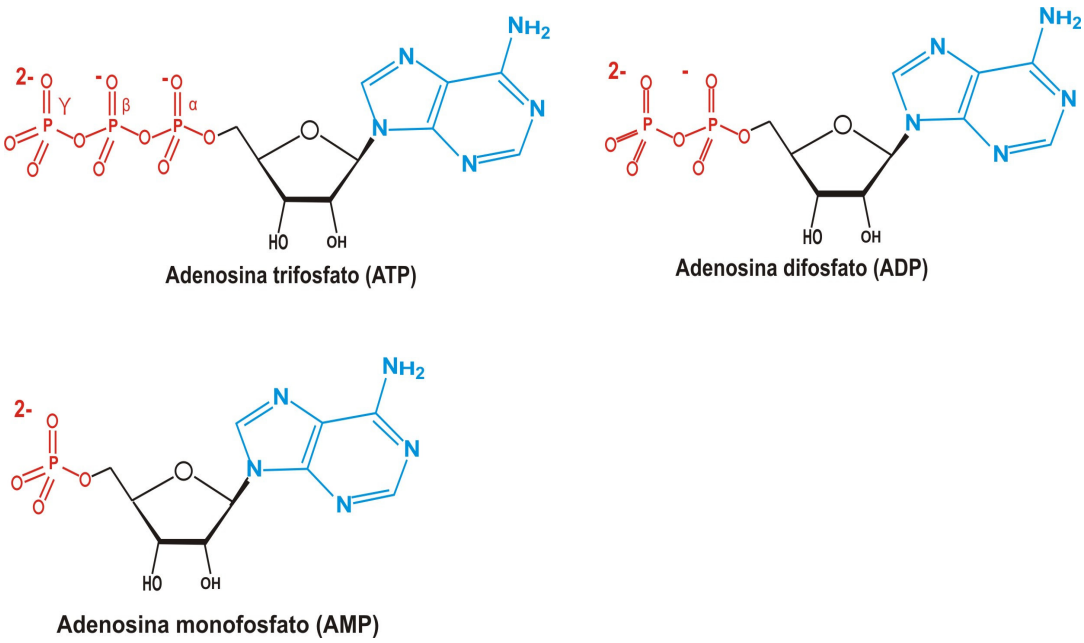

Figura 3.4 *– Estruturas de ATP, ADP e AMP [Adaptado de BERG et al., 2004, p. 393].*

A energia liberada na hidrólise da ATP é aproveitada para impulsionar reações que necessitam de uma entrada de energia livre, como a contração muscular. O ciclo ATP-ADP é o modo mais funcional da troca de energia nos sistemas biológicos [MOTTA, 2003].

Conforme citado no capítulo anterior, as enzimas podem catalisar a transferência do fosfato terminal de um nucleotídeo para outro. A fosforilação dos nucleotídeos monofosfatos é catalisada por uma família de nucleotídeo monofosfato cinase. Os nucleotídeos difosfato é catalisado pelo nucleotídeo difosfato cinase, uma enzima com ampla especificidade.

A ATP é conhecida como um composto de fosfato de alta energia e suas ligações de anidrido fosfórico são ditas ligações ricas em energia. De fato, um til (~ P) é com freqüência utilizado para indicar tal ligação. Entretanto, não há nada de especial acerca das ligações em si. Elas são ligações ricas em energia no sentido de que muita energia é liberada quando são hidrolisadas [BANGSBO et al., 2001] (Figura 3.5).

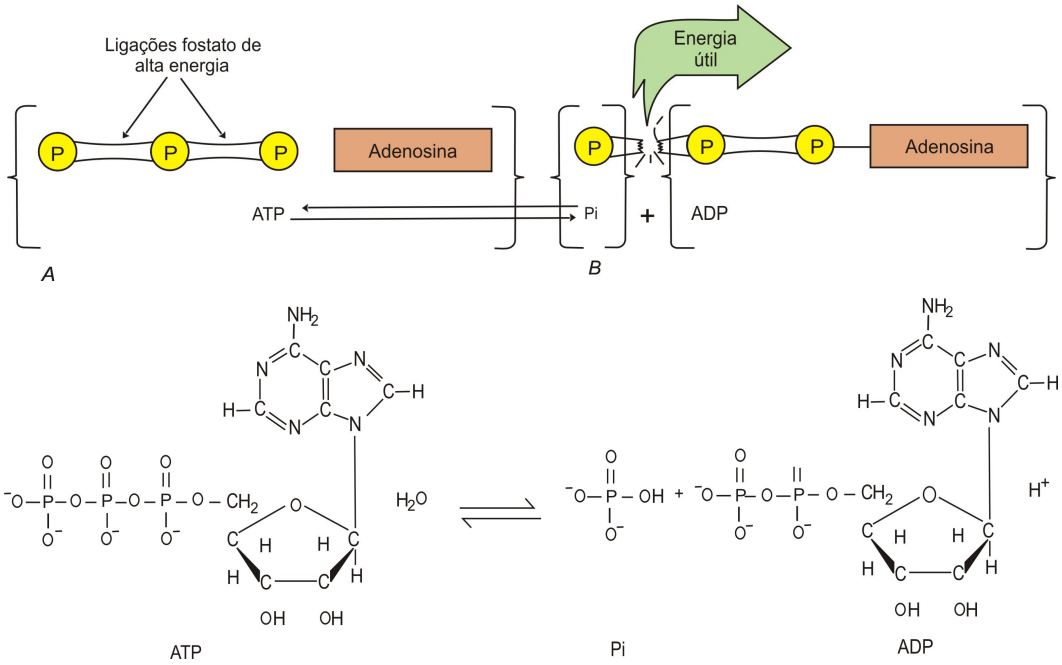

Figura 3.5 *– Estrutura da molécula de ATP mostrando as ligações do fosfato de alta energia. Quando o terceiro fosfato da molécula de ATP é separado da adenosina pela ação da ATPase, a energia é liberada [Adaptado de FOSS et al., 2000, p. 20].*

Ao contrário do que muitos acreditam, a ATP não deve ser considerada como um grande depósito de energia ou um local de armazenamento a longo prazo, mas como o principal doador imediato de energia livre num sistema biológico.

O organismo humano não possui uma quantidade congênita ou adquirida de moléculas da ATP com energia pronta para ser oferecida quando existir qualquer necessidade metabólica e nem deve ser considerado que a molécula de ATP, depois de formada, fica a disposição da célula até que esta tenha a necessidade de utilização.

Numa célula típica, uma molécula é consumida dentro de um minuto após a sua formação. Embora a quantidade total da ATP no organismo seja limitada a aproximadamente 100g, a renovação desta pequena quantidade de ATP é muita alta. O carbono nas moléculas alimentares, como glicose e lipídeos, é oxidado a dióxido de carbono (carbon dioxide - CO_2) e a energia liberada é utilizada para regenerar ATP partindo de ADP e Pi [STRAJB et al., 2003].

Embora moléculas de alimentos sejam mais complexas do que compostos de um único carbono, quando um alimento é oxidado, a oxidação ocorre num carbono de cada

vez. A energia de oxidação do carbono é utilizada em alguns casos para criar compostos de alto potencial de transferência de fosforila e em outros casos para criar um gradiente iônico. Em qualquer um deles, o ponto final é sempre a formação da ATP.

3.3 Creatinina e a Contração Muscular

No organismo, a ATP não é a única forma de fornecimento de energia. Outros compostos também possuem este potencial e, algumas vezes, de maneira mais rápida.

A fosfocreatina é um destes produtos com potencial para o processo de fosforilação. Armazenada nos músculos, atua como um reservatório de fosforilas de alto potencial que podem ser prontamente transferidas a ATP. De fato, utilizamos fosfocreatina para regenerar ATP, a partir do ADP, cada vez que exercitamos extenuadamente. Esta reação é catalisada por uma enzima denominada creatina quinase [DAHLSTEDT et al., 2001] (Figura 3.6).

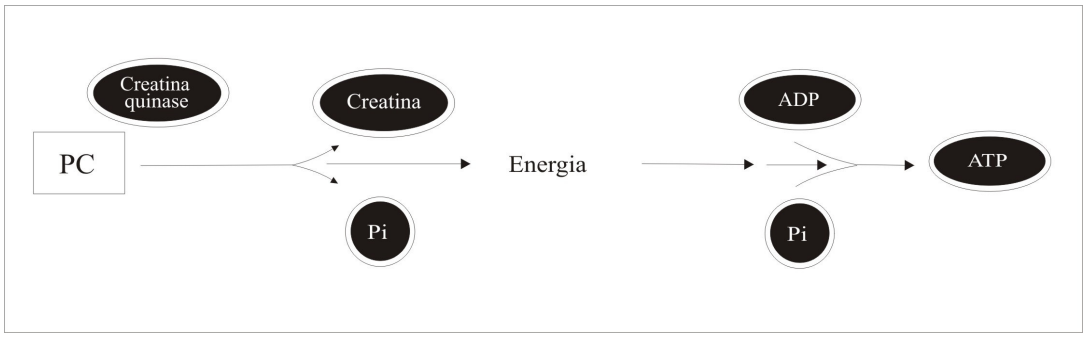

Figura 3.6 *– Catalise da fosfocreatina pela creatina quinase [Modificado de WILMORE et al., 2001, p. 121].*

O sistema fosfagênio é, sem dúvida, o primeiro e o mais simples mecanismo para o processo energético, no qual a energia para a ressíntese da ATP provém apenas de um único composto, a fosfocreatina [HOCHACHKA et al., 1999]. O importante, inicialmente, é entender como ocorre a depleção e a ressíntese deste primeiro processo de produção de energia.

No músculo em repouso, existem as seguintes concentrações de ATP, ADP, fosfocreatina e creatina respectivamente: 4 mM, 0,013 mM, 25 mM e 13 mM. A quantidade de ATP no músculo é suficiente para sustentar a atividade contrátil por menos de um segundo. Dessa maneira, a alta concentração de fosfocreatina e seu alto

potencial de transferência de fosforila em relação ao da ATP, tornam-na um tampão de fosforila altamente eficiente [DAHLSTEDT et al., 2000]. A Figura 3.7 demonstra a relação do gasto energético, oriundo da hidrólise da fosfocreatina e da ATP, em relação ao tempo durante o metabolismo aeróbico e anaeróbico.

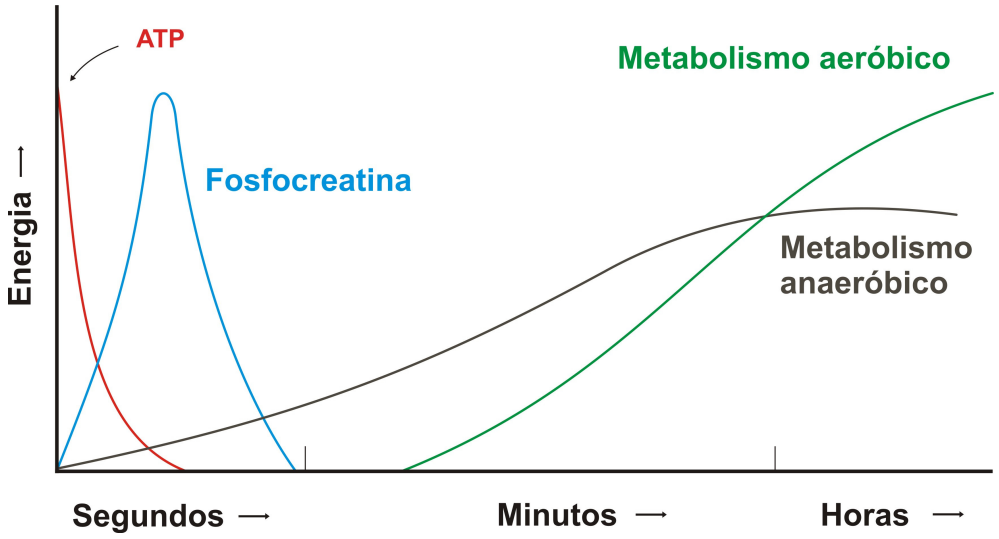

Figura 3.7 *– Fontes de ATP durante a atividade física [Adaptado de BERG et al., 2004, p. 396].*

A fosfocreatina, assim como a ATP, é armazenada nas células musculares e consegue fornecer energia quando os seus grupamentos fosfatos são removidos, liberando uma grande quantidade de energia que imediatamente fica disponível ou acoplada a ressíntese de ATP [PERALTA et al., 2002].

Esse processo é rápido e pode ser obtido sem qualquer estrutura especial no interior da célula. Embora ele possa ocorrer na presença de oxigênio, esse processo não exige oxigênio e, por essa razão, considera-se o sistema fosfagênio como sendo anaeróbico [DAHLSTEDT et al., 2001].

Os produtos finais da desintegração da fosfocreatina são: a creatina (creatine - C) e o fosfato inorgânico (Pi) [HOCHACHKA, 1999; DAHLSTEDT et al., 2001]. A ressíntese ocorrerá por estas mesmas substâncias, através da energia liberada pela desintegração de ATP.

Após um exercício, a restauração do fosfanogênio é muito rápida, mas posteriormente bem mais lenta, com 70% sendo completados dentro de 30 segundos e 100% completados dentro de três a cinco minutos [WACKERHAGE et al., 1998].

3.4 A Produção de Energia

Em algum momento na nossa caminhada evolutiva, as espécies necessitaram de algum tipo de alimento que pudesse gerar energia. Várias teorias, ao longo dos séculos, trouxeram algum tipo de explicação para este fenômeno da criação. Estes conceitos evoluíram de Aristóteles, com a teoria da geração espontânea, para o fixismo, o criacionismo, até Stanley Miller com a experiência da formação espontânea da glicose na chamada "sopa fundamental", originada das descargas elétricas na atmosfera terrestre, que naquele momento, era formada por metano, amônia, hidrogênio e vapor d'água [HALL, 2002; JERMIIN et al., 2005].

Esta geração de energia oriunda da quebra da glicose foi uma das principais reações que produziram o combustível necessário para o desenvolvimento do metabolismo. Muitas espécies começaram a surgir no ambiente terrestre, seres nos quais os alimentos deveriam ser adquiridos do meio externo (denominados heterótrofos) e os seres que, por uma organização molecular, conseguiam produzir o seu próprio alimento (autótrofos) [FORSDYKE, 2002].

Com o passar dos séculos, a atmosfera começou a alterar a sua composição, assim como, iniciou-se o resfriamento da Terra e a geração espontânea de glicose diminuiu e cessou. Dessa maneira, começaram a ganhar espaço no ambiente os seres autótrofos. Estes seres, no processo de produção de alimento e energia, começaram a liberar na atmosfera um gás que mudaria significativamente o futuro, o oxigênio.

A presença do oxigênio alterou a organização evolutiva e com a incorporação de uma bactéria, hoje conhecida como a organela mitocôndria, iniciou o processo evolutivo de dois mecanismos distintos de produção de energia que foram fundamentais para a evolução da ação muscular: o sistema anaeróbico e o sistema aeróbico [JERMIIN et al., 2005].

A diferença entre os sistemas, anaeróbicos e aeróbicos, está na presença da molécula de oxigênio, ou seja, as reações observadas no primeiro processo ocorrem na ausência completa de oxigênio e o segundo, apenas ocorre com sua presença. Estes mecanismos ocorrem em locais diferentes, utilizam substâncias diferentes para a realização do mecanismo e geram outras substâncias, úteis ou não para o organismo.

Tanto o sistema aeróbico quanto o anaeróbico, fazem parte do processo de respiração, que se define como um processo bioquímico que permite os seres vivos extrair energia química armazenada nos alimentos para serem utilizadas nas atividades metabólicas, onde a principal forma de produção é a fosforilação [CAMPBELL-O'SULLIVAN et al., 2002].

A fosforilação é um dos principais participantes nos mecanismos de formação energética, onde um radical fosfato inorgânico (Pi) é adicionado a uma molécula de adenosina difosfato (ADP) se convertendo na ATP [CAMPBELL-O'SULLIVAN et al., 2002]. A molécula de ATP armazena a energia que fica a disposição da célula. A eliminação de um grupo fosfato na ATP supõe a liberação de 30,6 kJ/mol, ou seja, energia [JENESON et al., 2000; STRAJB et al., 2003].

Os organismos vivos necessitam de uma entrada contínua de energia para três propósitos principais: (1) desempenho do trabalho mecânico na contração muscular e outros movimentos celulares; (2) o transporte ativo de moléculas e íons; e (3) a síntese de macromoléculas e outras biomoléculas a partir de precursores simples. A energia livre utilizada nestes processos, que mantém um organismo num estado que está próximo do equilíbrio, deriva do ambiente aeróbico e anaeróbico [DE GROOT et al., 1989].

O músculo é um grande consumir de energia, mas nem todas as unidades motoras dos músculos esqueléticos funcionam da mesma maneira, pois nem todas as fibras musculares que formam este músculo possuem as mesmas capacidades metabólicas e funcionais. Todas as fibras estão capacitadas para trabalharem em condições aeróbicas e anaeróbicas, mas algumas têm a capacidade bioquímica e morfológica para contraírem melhor sob condições aeróbicas enquanto outras sob ambiente anaeróbico.

No músculo ativo, a contração é a maior usuária da energia produzida por ATP. Mesmo sendo uma condição básica para o processo de contração, nosso organismo

possui uma quantidade muito limitada de ATP disponível para a realização imediata das funções musculares. Desta forma, precisamos ressintetizá-lo continuamente através da degradação dos vários nutrientes presentes no organismo [ØRTENBLAD et al., 2003].

É difícil calcular a quantidade de energia total de um músculo, pois as quantidades das substâncias alimentares para a produção de energia (carboidrato, gordura e proteínas) são variáveis dentro do corpo humano. Em uma situação de repouso, as substâncias alimentares que utilizamos para a nossa manutenção são a gordura e a glicose e a quantidade de oxigênio que necessitamos é provido satisfatoriamente pelo sistema cárdio-respiratório, ou seja, a quantidade de ATP nesta situação, é suficiente para as funções vitais. Esta é a razão para o sistema anaeróbico permitir que estas ações de fornecimento de ATP, para as funções vegetativas, possam ocorrer sem a necessidade de grandes quantidades de oxigênio [WALTER et al., 1999].

Neste momento, qualquer célula no organismo humano está necessitando ou passando por um processo de produção de energia. A energia orgânica está sendo extraída dos alimentos e utilizada para impulsionar os processos de biossíntese. Estas transformações compõem o que chamamos de metabolismo.

O metabolismo é, essencialmente, uma série de reações químicas ligadas que começam com uma molécula em particular e a converte em outra molécula ou moléculas de um modo cuidadosamente definido. Podemos dividir as vias metabólicas em duas classes amplas: (1) as que convertem energia para formas biologicamente utilizáveis e (2) as que necessitam de energia para ocorrerem [JENESON et al., 2000].

As reações que transformam alimento em energia celular são ditas reações catabólicas ou, mais usualmente, catabolismo. As reações que necessitam de energia, como a síntese de glicose, lipídeos ou ácido desoxirribonucléico (desoxyribonucleic acid - DNA), são ditas reações anabólicas ou anabolismo. As formas de energia que se produzem no catabolismo são empregadas no anabolismo para gerarem estruturas complexas a partir das mais simples. Algumas vias podem ser anabólicas ou catabólicas dependendo das condições energéticas das células [WACKERHAGE et al., 1998].

3.4.1 Controle Metabólico e o Fluxo Sanguíneo

O processo de formação energética, especificamente provenientes dos carboidratos e dos lipídeos, nada mais é do que uma transferência de elétrons que serão utilizados para a formação da ATP.

A transferência de elétrons ocorre da maneira esperada na presença de carreadores, sendo que a ATP é um dos principais carreadores do metabolismo. Outros carreadores também são necessários para a transferência de elétrons, dentre eles podemos destacar os carreadores especiais que são os nucleotídeos de pirimidina ou flavina e os seus derivados, como a nicotinamida adenina dinucleotídeo (nicotinamidade adenine dinucleotide - NAD), derivado da pirimidina, que é o principal carreador na oxidação de moléculas orgânicas [BANGSBO et al., 2001].

Para que o metabolismo e a transferência de elétrons possam ocorrer de forma fisiológica no tecido muscular, é necessário que a circulação sanguínea nos mesmos seja satisfatória. Esta condição é necessária para que ocorra a chegada de produtos necessários ao processo e eliminação dos catabólicos que poderiam interferir na fosforilação.

Um músculo contraturado tem no seu interior uma diminuição significativa de sangue e, conseqüentemente, do fluxo de oxigênio e nutrientes, ou seja, uma isquemia vascular é observada nos músculos onde a atividade excede o tônus vascular e ocorre uma diminuição do suprimento sanguíneo [HOCHACHKA, 1999; JUBRIAS et al., 2003].

A manutenção do fluxo sanguíneo é fundamental para a restauração dos sistemas de produção de energia em músculos contraturados. A qualidade da contração muscular quanto ao ritmo de recuperação da força muscular, se correlacionam com a densidade de capilares musculares, isto é, ao fornecimento de um fluxo sanguíneo potencialmente maior. O fluxo sanguíneo interrompido pela contração, não é essencial para suprir a energia via fosfagênios [JUBRIAS et al., 2003; MCCLELLAND et al., 2005].

3.5 Conclusão

Neste capítulo, concluímos que para o entendimento da contração muscular, é necessário o conhecimento das substâncias químicas que estão diretamente ou indiretamente envolvidas no processo metabólico de produção de energia e da contração do músculo.

Concluímos, também, que as enzimas possuem função fundamental nos processos fisiológicos, pois catalisam todas as reações metabólicas e capacitam aos organismos a construção de outras moléculas, como as proteínas, os ácidos nucléicos, carboidratos e lipídeos. Em relação à produção energética e na contração muscular, as enzimas são fundamentais, pois toda contração passa inevitavelmente por reações químicas, por uma atividade onde uma substância ou substrato precisa se aderir a outra para formar um novo produto ou para produzir energia.

Observamos ainda que a ATP é um nucleotídeo responsável pelo armazenamento de energia em suas ligações químicas e quando a ligação trifosfato são rompidas, uma grande quantidade de energia é liberada para ser utilizada por diversos processos biológicos, tais como o transporte ativo de moléculas, síntese e secreção de substâncias, locomoção, divisão celular, entre outros. Para isto, é importante a manutenção do fluxo sanguíneo e de nutrientes.

No próximo capítulo, iniciaremos a abordagem sobre o mecanismo de contração muscular, descrevendo os tipos de fibras musculares, a química envolvida no processo de contração e, principalmente, a ação do cálcio e do fosfato inorgânico na contração muscular.

Capítulo 4

A Contração Muscular e as Substâncias Séricas

O movimento é um dos principais mecanismos que ajudaram no processo evolutivo. A possibilidade de se locomover proporcionou aos seres vivos a busca pelo alimento e até a fuga nos momentos de perigo.

No processo de evolução, o movimento necessitou de muitas alterações e respostas distintas que tiveram de ser modificadas e adaptadas, sendo necessárias mudanças na conexão estímulo-resposta, no programa motor, no esquema motor, nas estruturas coordenativas, na modulação, nas estruturas hierárquicas centrais e periféricas, entre outras.

A complexidade do movimento também é traduzida pela complexidade de estruturas que participam do processo de contração muscular. Uma quantidade considerável de estruturas, produtos orgânicos e inorgânicos, hormônios, potenciais elétricos, entre outras substâncias devem ser consideradas para que possamos entender o quanto é importante e precioso o movimento humano.

Nos próximos itens, descreveremos as estruturas envolvidas no processo de contração muscular e, no final, abordaremos as substâncias séricas, especificamente o

cálcio e o fosfato inorgânico, fundamentais para que o processo de contração possa ocorrer. Finalizaremos o capítulo, abordando sobre o fosfato de cálcio, originado da interação química entre o cálcio e o fosfato inorgânico e sua influencia na contração muscular através da diminuição da quantidade de íons cálcio disponível para a interação entre as pontes cruzadas do músculo.

4.1 Fibras Musculares (Sistema Muscular Esquelético)

A organização muscular é formada por vários tipos de músculos, sendo denominados de esqueléticos ou estriados, lisos, cardíaco e células mioepiteliais. Neste trabalho, descreveremos em detalhes, apenas o músculo esquelético.

O sistema muscular esquelético constitui a maior parte da musculatura do corpo, recobrindo totalmente o esqueleto e por estar fixado aos ossos é responsável pela movimentação corporal.

Os músculos esqueléticos estão revestidos por lâminas delgadas de tecido conjuntivo, sendo a sua nomenclatura de acordo com a sua posição em:

- epimísio, tecido conjuntivo que reveste todo o músculo. O epimísio é responsável pela formação do tendão e pela transmissão da força de contração do ventre muscular para o tendão;

- perimísio, que manda septos para o interior do músculo, septos dos quais se derivam divisões sempre mais delgadas. Dessa maneira, o músculo fica dividido em feixes primários, secundários e terciários.

- endomísio, revestimento dos feixes menores (primários) que manda para o interior do músculo membranas delgadíssimas que envolvem cada uma das fibras musculares [SCOTT et al., 2001; MINAMOTO, 2005] (Figura 4.1).

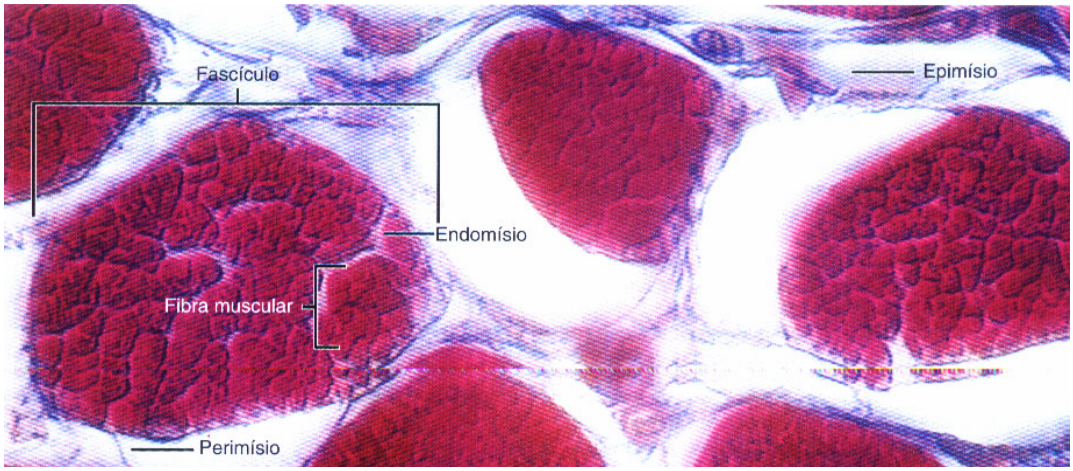

Figura 4.1 *– Relação entre tecidos conjuntivos e a membrana celular do músculo esquelético [Modificado de FOSS et al., 2000, p. 122].*

A fibra muscular é uma célula cilíndrica ou prismática, longa, de 3 a 12 centímetros, com o seu diâmetro infinitamente menor, variando de 20 a 100 micrômetros, tendo um aspecto de filamento fusiforme. No seu interior notam-se muitos núcleos, originado da fusão de mioblastos. Dessa forma, podemos dizer que um músculo esquelético é um pacote formado por longas fibras que percorrem o músculo de ponta a ponta [SCOTT et al., 2001] (Figura 4.2).

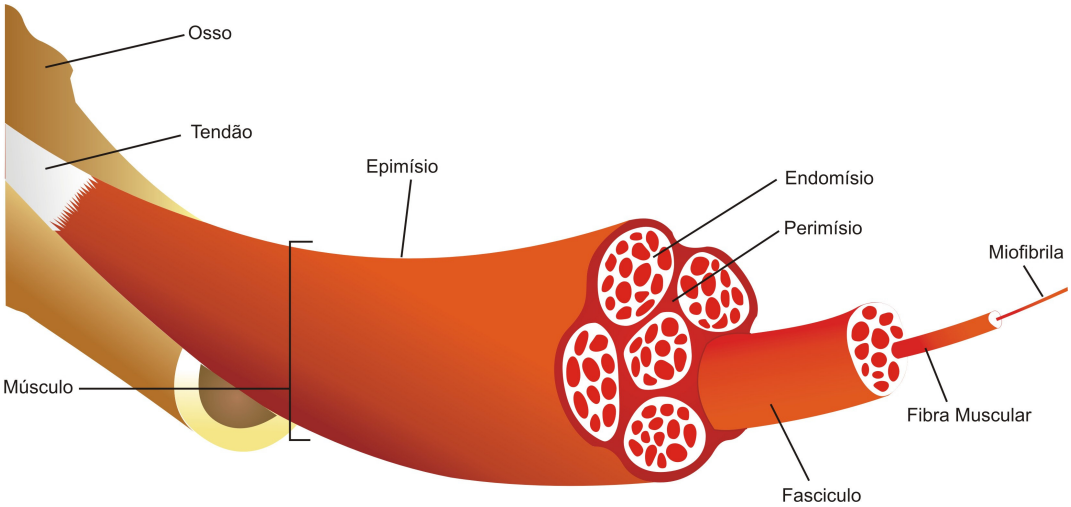

Figura 4.2 *– Fibras musculares e os tecidos conjuntivos [Alterado de WILMORE et al., 2001, p. 26].*

No sarcoplasma da fibra muscular esquelética há muitas miofibrilas contráteis que são constituídas por unidades que se repetem ao longo de seu comprimento, denominadas sarcômeros.

Os sarcômeros são constituídos por filamentos compostos por dois tipos principais de proteínas, denominados de actina e miosina. Os filamentos de actina e miosina estão dispostos regularmente e originam um padrão bem definido de estrias (faixas) transversais alternadas, claras e escuras [IRVING et al., 2000; EGELMAN, 2001].

As faixas mais extremas e mais claras do sarcômero, chamadas banda I, contêm apenas filamentos de actina. Dentro da banda I existe uma linha denominada linha Z, que corresponde a várias uniões entre dois filamentos de actina, ou seja, divide a banda I. A faixa central, mais escura, é chamada banda A, cujas extremidades são formadas por filamentos de actina e miosina sobrepostos. Dentro da banda A existe uma região mediana mais clara denominada de banda H, no qual contém apenas miosina e só aparece quando o músculo está em repouso. Um sarcômero compreende o segmento entre duas linhas Z consecutivas e é a unidade contrátil da fibra muscular, pois é a menor porção com capacidade de contração e extensibilidade [XIAO et al., 2003] (Figura 4.3).

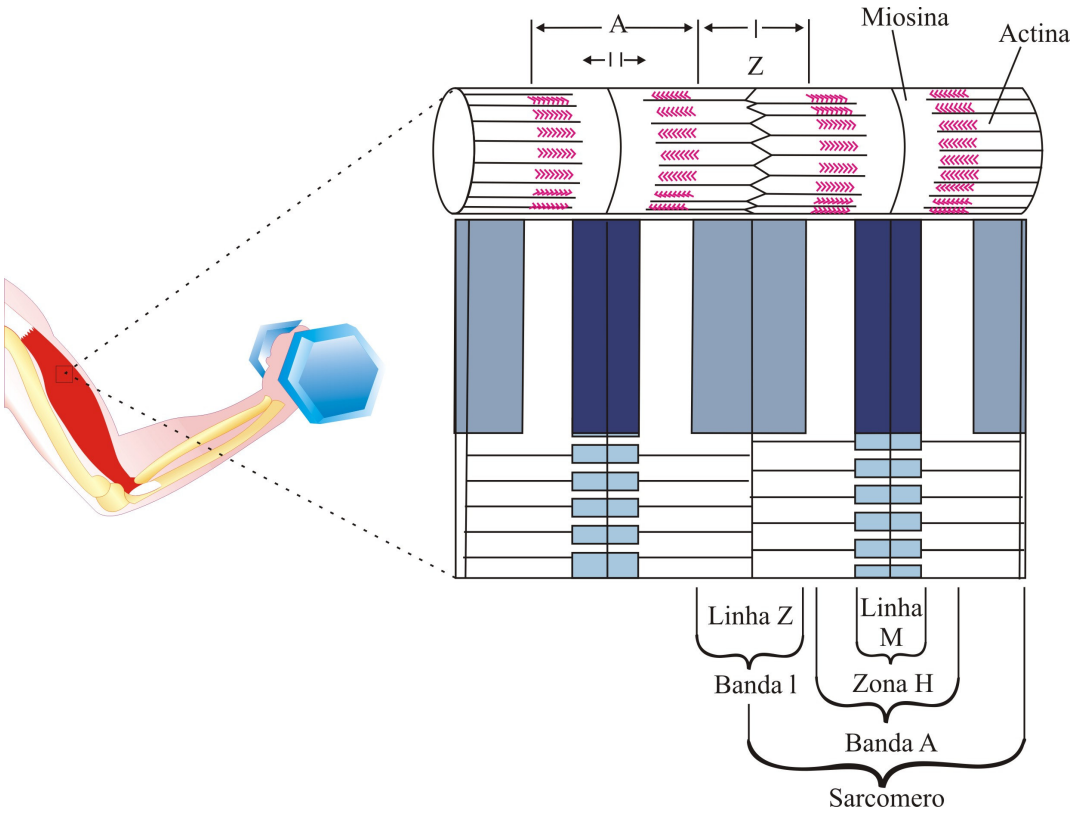

Figura 4.3 *– Exemplo de um sarcômero (Unidade funcional básica de uma miofibrila) [Modificado de WILMORE et al., 2001, p. 32].*

A contração do músculo esquelético é voluntária e ocorre pelo deslizamento dos filamentos de actina sobre os de miosina. Nas pontas dos filamentos de miosina existem pequenas projeções capazes de formar ligações com sítios ativos da actina quando o músculo é estimulado. Essas projeções de miosina puxam os filamentos de actina, forçando-os a deslizar sobre os filamentos de miosina. Este deslizamento leva ao encurtamento do sarcômero em série e à contração muscular. Durante a contração muscular, o sarcômero diminui devido à aproximação das duas linhas Z [SCOTT et al., 2001; XIAO et al., 2003].

Ao redor do conjunto de miofibrilas de uma fibra muscular esquelética situa-se o retículo sarcoplasmático, especializado no armazenamento de íons cálcio [CHIESI et al., 1981; FAVERO, 1999; BALOG et al., 2001] (Figura 4.4).

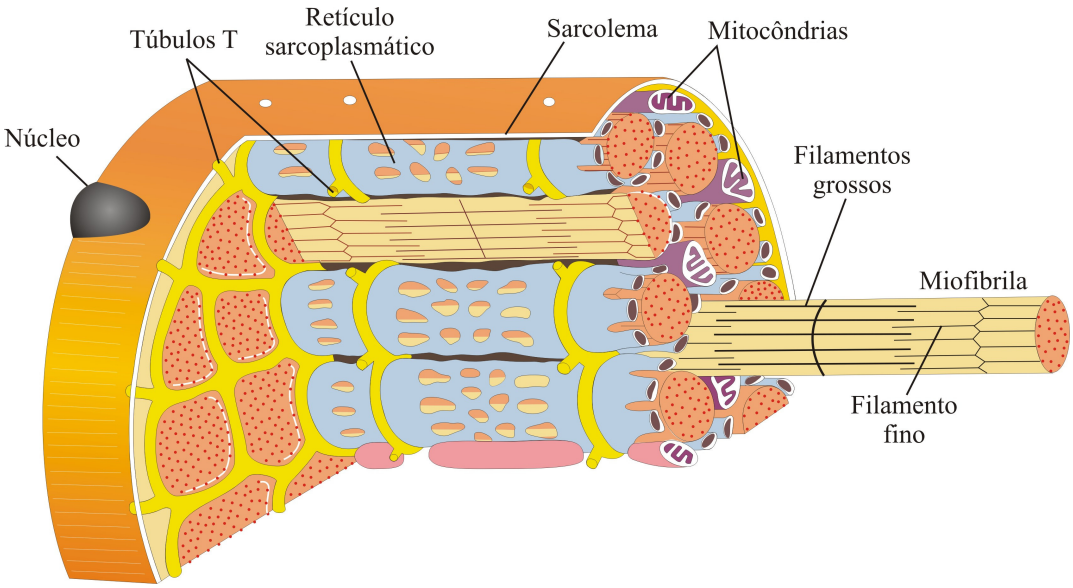

Figura 4.4 *– Representação de um Retículo Sarcoplasmático [Modificado de SILVERTHORN, 2003, p. 349].*

Constatou-se, através de microscopia eletrônica, que o sarcolema sofre invaginações, formando túbulos anastomosados que envolvem cada conjunto de miofibrilas. Essa rede foi denominada sistema T, pois as invaginações são perpendiculares as miofibrilas. Esse sistema é responsável pela propagação do potencial de ação uniforme de cada fibra muscular estriada esquelética, não ocorrendo nas fibras lisas e sendo reduzido nas fibras cardíacas [SOELLER et al., 1999; FRIEDRICH et al., 2001].

O estímulo para a contração muscular é geralmente um impulso nervoso motor que chega à fibra muscular através de um nervo [STUART et al., 2001; ZHANG et al., 2006]. O impulso nervoso propaga-se pelo sarcolema e atinge o retículo sarcoplasmático fazendo com que o cálcio, ali armazenado, seja liberado no sarcoplasma [SYKES, 2003].

O retículo sarcoplasmático armazena íons cálcio em concentrações muito elevadas. No entanto, quando um potencial de ação percorre os túbulos T, ocorre uma passagem do fluxo de corrente através das cisternas do retículo sarcoplasmático. As cisternas projetam suas junções que rodeiam o túbulo T, provavelmente para facilitar a passagem do fluxo. Este estímulo desencadeia uma rápida libertação de íons cálcio pelas cisternas, presumivelmente pela abertura de canais de cálcio. Os íons cálcio, assim

libertados pelas cisternas do retículo sarcoplasmático, aumentam a sua concentração no sarcoplasma que banha as miofibrilas e desencadeiam a contração muscular [DUKE et al, 2000; STIENEN et al, 2000].

Ao entrar em contato com as miofibrilas, o cálcio libera os sítios de ligação da actina e permite a ligação da miosina iniciando a contração muscular. Assim que cessa o estímulo, o cálcio é imediatamente rebombeado para o interior do retículo sarcoplasmático, o que faz cessar a contração [EGELMAN, 2001; KRENDEL et al., 2005].

A energia necessária para a contração muscular é suprida por moléculas de ATP. A ATP atua tanto na ligação da miosina à actina quanto em sua separação que ocorre durante o relaxamento muscular.

A quantidade de ATP presente na célula muscular é suficiente para suprir apenas alguns segundos de atividade muscular intensa. Quando a fibra muscular necessita de energia para manter a contração, grupos fosfatos ricos em energia são transferidos da fosfocreatina para o ADP, que se transforma em ATP. Quando o trabalho muscular é intenso, as células musculares repõem seus estoques de ATP e de fosfocreatina pela intensificação da respiração celular. Para isso, utilizam o glicogênio armazenado no sarcoplasma das fibras musculares como combustível, sendo esta conversão ocorrendo por via anaeróbica ou aeróbica.

4.1.1 Tipos de Fibras

O músculo esquelético é constituído por diferentes tipos de fibras musculares que se distinguem quanto as suas propriedades estruturais, funcionais e bioquímicas. A característica heterogênea do tecido muscular foi reconhecida inicialmente por Ranvier, em 1873. Naquela época, as fibras musculares foram classificadas de acordo com suas características morfológicas sendo denominadas de fibras vermelhas ou brancas. A coloração avermelhada se deve a grande quantidade de mioglobina e capilares, o que resultam em maior capacidade oxidativa das fibras vermelhas em relação às fibras brancas [EGELMAN, 2001; SPANGENBURG et al., 2003; SYKES, 2003].

Uma alternativa para a classificação das fibras musculares está relacionada com as propriedades funcional ou contrátil. Conforme a velocidade de contração muscular, as fibras musculares passaram a ser classificadas de acordo com as propriedades funcionais em fibras de contração rápida, intermediária e lenta [SCOTT et al., 2001].

Ao longo dos anos, e com o desenvolvimento das técnicas de avaliação, as fibras musculares passaram a ser classificadas de acordo com os níveis de fatigabilidade. Algumas fibras musculares apresentam alta capacidade de gerar tensão, mas são mais suscetíveis à fadiga. Em contrapartida, outras fibras musculares, embora não tivessem capacidade de gerar altos níveis de tensão, são mais resistentes ao processo de fadiga. Estas diferenças classificaram-nas em fibras rápidas, com baixa resistência à fadiga, rápidas, com moderada resistência à fadiga e lentas, com alta resistência à fadiga [PETTE et al., 1999; ESSE´N-GUSTAVSSON et al., 2002].

Com o avanço nos tipos e na qualidade da tecnologia empregada para avaliação muscular, como a morfometria e microfotometria, que permitem uma análise de vários parâmetros histoquímicos da adenosina trifosfatase (ATPase) miofibrilar ou ATPase das miosinas (mATPase), bem como da atividade das enzimas metabólicas, novas classificações para os diferentes tipos de fibras musculares foram propostas [PETTE et al., 1999].

As fibras foram classificadas em tipo I e do tipo II, sendo que, o segundo tipo sofreu duas subdivisões, denominando-as de fibras do tipo IIA e do tipo IIB. A diferença entre ambas é que a fibra do tipo IIB é a mais rápida, seguida pelas fibras dos tipos IIA e I [SPANGENBURG et al., 2003].

Apenas como efeito de exemplificação, a análise histoquímica de coloração da mATPase estabelece o tipo específico da fibra muscular com base na sensibilidade da mATPase diante de diferentes níveis de pH (Figura 4.5). Em condições de alcalose (Figura 4.5a, pH=10,4), a mATPase das fibras de contração lenta (tipo I) é ativada e adquirem uma coloração clara, ao passo que, em meio ácido (Figura 4.5b, pH=4,3 e Figura 4.5c, pH=4,55), onde as mATPases das fibras tipo I não são ativadas, a coloração se torna escura. Por outro lado, a mATPase das fibras de contração rápida (tipo II), em condições de acidose, não é ativada e apresentam coloração escura. Um fato interessante é que no meio alcalino, as mATPases das fibras de contração rápida

apresentam comportamentos diferenciados. Na realidade, essas respostas diferenciadas das mATPases permitem a distinção de diferentes subgrupos da fibra do tipo II (IIC, IIA, IIAB e IIB) [HOSTLER et al., 2001].

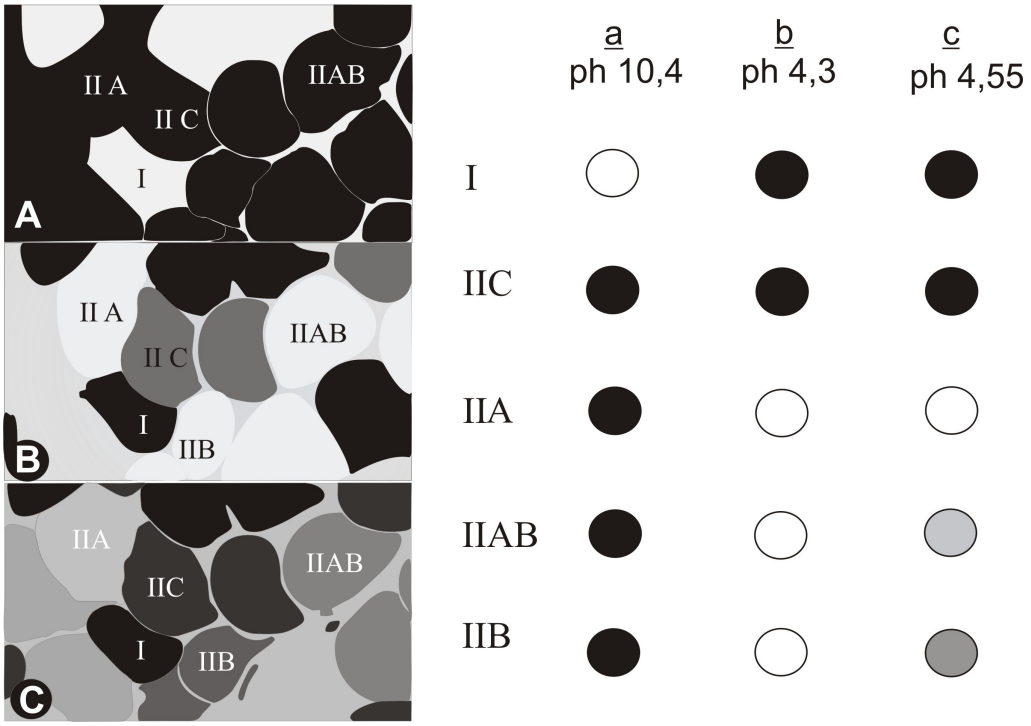

Figura 4.5 *– Esquema ilustrativo da análise histoquímica em secção transversal de um músculo para identificar a coloração da mATPase submetida a diferentes níveis de pH (a: pH=10,4; b: pH=4,3; c: pH=4,55). Neste exemplo, é possível determinar cinco tipos de fibras musculares (I, IIC, IIA, IIAB e IIB) [Modificado de HOSTLER et al., 2001, p. 114].*

Resumidamente, as classificações podem ser estabelecidas mediante as propriedades morfológicas (fibras vermelhas e fibras brancas), em relação à velocidade de encurtamento muscular (fibras de contrações rápida, intermediária e lenta), quanto ao processo da fadiga (fibras rápidas com baixa resistência à fadiga, rápidas com moderada resistência à fadiga e lentas com alta resistência à fadiga), ou ainda com base na coloração da miosina ATPase (fibras do tipo I, IC, IIC, IIAC, IIA, IIAB e IIB).

A identificação das diferentes isoformas da cadeia pesada da miosina (myosin heavy chain - MHC) pela análise imunohistoquímica, utilizando anticorpos antimiosina, também permite outra classificação das fibras musculares [STARON, 1997; PETTE et al., 1999].

A MHC é a porção da cabeça da molécula de miosina que determina a velocidade da reação das pontes cruzadas com os filamentos de actina e, conseqüentemente, a velocidade de contração muscular. As diferentes fibras classificadas segundo a atividade ATPásica da miosina correspondem às diferentes isoformas da MHC [WILLIAMS et al., 2002].

Com a utilização do método imunohistoquímico para a classificação dos tipos de fibras encontramos uma diversidade muito grande da MHC, o que faz com que os músculos de vertebrados sejam compostos por diferentes tipos de fibras musculares [GOLDSPINK et al., 1998].

As fibras musculares foram, de modo geral, divididas em fibras puras e as híbridas [STARON, 1997]. As primeiras são classificadas como as dos tipos I, IIA, IIB e IIX ou IID. Esta última foi recentemente identificada e denominada tipo IIX ou IID devido à sua abundante presença no músculo diafragma de ratos. Já as fibras híbridas, cuja particularidade é a presença de duas MHC, são fibras mistas, ou seja, fibras dos tipos IIBD, IIAD, IC, IIC [MINAMOTO, 2005].

Essa grande diversidade nos tipos de fibras forma um mosaico na anatomia dos músculos esqueléticos. Assim, não existe um músculo composto exclusivamente de fibras dos tipos I ou II (com seus vários subtipos), isto é, não existe somente um único tipo de fibra muscular compondo um determinado músculo. Os músculos são compostos por diferentes tipos de fibras, mas com predomínio de um tipo específico.

4.1.2 Recrutamento das Fibras Musculares

A unidade funcional do controle do movimento é a unidade motora, formada por um motoneurônio-α e por todas as fibras musculares por ele inervadas. Quanto menor o número de fibras inervadas pela unidade motora, menor a capacidade de produção de força, embora, a função de controle dos movimentos finos seja aumentada [LIEBER et al., 2001]. Como pode ser observado existe uma estreita relação entre tipos de fibras musculares e unidades motoras.

Nesse sentido, as unidades motoras se distinguem quanto às propriedades funcionais, uma vez que, podem ser observados três tipos distintos de comportamento de acordo com a velocidade de contração e a resistência à fadiga (Figura 4.6).

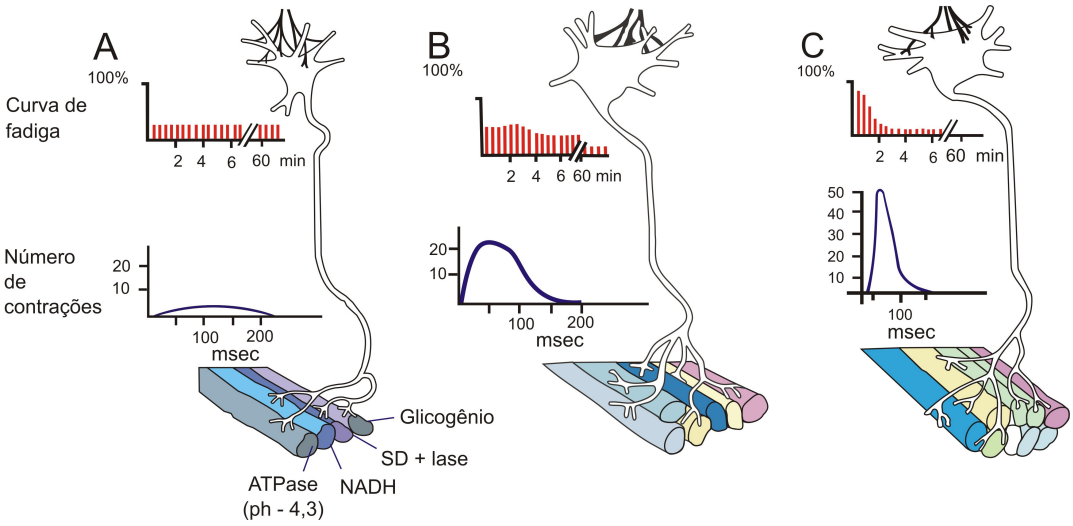

Figura 4.6 *– Propriedades funcionais da unidade motora. A - lenta, com alta resistência à fadiga; B - rápida, com moderada resistência à fadiga; C - rápida, com baixa resistência à fadiga [Modificado de ROBERGS et al., 2002, p. 3].*

Com base na figura acima, observa-se que as unidades motoras apresentam diferenças anatômicas. Se por um lado a unidade motora lenta (Figura 4.6A) é menor e apresenta baixa capacidade de gerar tensão, por outro lado é altamente resistente à fadiga. Na Figura 4.6B, a unidade motora com diâmetro intermediário, apresenta moderada capacidade de gerar tensão e é relativamente resistente à fadiga. A maior unidade motora, contudo, é a rápida (Figura 4.6C), visto que apesar de possuir alta capacidade de gerar tensão apresenta baixa resistência à fadiga.

Segundo Hogrel [2003, p. 417] o início do recrutamento das unidades motoras tem sido correlacionado com suas características estruturais e funcionais, como o "*tamanho do neurônio motor, velocidade de condução do nervo, taxa de disparo, resposta de contração, velocidade de condução da unidade motora e duração e amplitude do potencial de ação da unidade motora*".

Um aumento na amplitude, com um aumento na força, pode ser devido à combinação de três processos complementares: recrutamento das unidades motoras com

mais fibras, recrutamento das unidades motoras com fibras de diâmetros maiores ou recrutamento das unidades motoras para o local de detecção.

Entretanto, a correlação entre o limiar de recrutamento, o intervalo interpulso, a velocidade de condução e a amplitude do potencial de ação das unidades motoras sugerem que as características e o início de recrutamento da unidade motora são determinados pela sua função de acordo com o princípio do tamanho.

Os parâmetros da velocidade de contração e recrutamento das unidades motoras podem ser grandemente influenciados pelas características do sinal que é detectado pelos eletrodos, no caso da eletromiografia, dependendo da variação espacial das unidades motoras dentro do músculo e, sua tipologia ou seu controle dentro do sistema nervoso central [HOGREL, 2003].

Em um processo de avaliação muscular, devemos considerar três fatores que influenciam a resistência muscular: (1) fatores anatômicos (composição muscular, capilarização), (2) fatores fisiológicos (hormônios, enzimas, estoque de energia) e, (3) fatores funcionais (controle motor). Estes fatores devem ser considerados nas análises do potencial de ação das fibras musculares, em músculos contraturados e com diminuição do fluxo sanguíneo.

4.1.3 Tipos de Contração Muscular

Para que consigamos realizar a maioria dos nossos movimentos com sincronia e harmoniosidade, o músculo não se contrai isoladamente, em vez disso, diversos músculos em uma sincrônica combinação de intensidade de forças contribuem para produzir a força e coordenação desejada.

No corpo humano, a contração muscular necessariamente não produz movimento, como é o caso dos músculos antigravitacionais situados na região posterior da coluna em posição ortostática. Dessa maneira, existem vários tipos de contração que devem ser levadas em consideração:

1) Dinâmica: caracteriza-se pela alteração no comprimento muscular. Observa-se uma diminuição no comprimento do sarcômero em série e os filamentos tendem a se encontrar no centro da banda H. Esta contração é subdividida em:

Concêntrica – é o tipo mais comum de contração muscular e ocorre em atividades rítmicas quando o músculo se encurta na medida que desenvolve tensão. O torque interno é maior do que o torque externo. Como exemplo este tipo de contração temos a flexão do cotovelo pela ação do bíceps braquial.

Excêntrica- é o alongamento do músculo na medida que perde tensão. Isto é obtido quando o peso é abaixado através do arco de movimento. O músculo cede à resistência, permitindo ser estirado. A ação do tibial anterior evitando o excesso de flexão plantar é um exemplo deste tipo de contração.

Isocinética - tipo de exercício que mantém tensão e velocidade constante à medida que os músculos se encurtam ou estiram [ITOI et al., 1997; WANG et al., 2000]. Esta contração é realizada por um dinamômetro isocinético que tem como objetivo manter a mesma velocidade angular em todas as amplitudes de movimento.

2) Estática (Isométrica): tipo de contração onde não se observa alteração do comprimento do músculo, a energia liberada pela ATP não pode ser transformada em trabalho e, portanto, resulta na produção de calor [WILLEMS et al., 1999; KUBO et al., 2001]. Um exemplo são músculos posteriores para manutenção da postura da coluna na posição ereta.

Até o momento foi descrito sobre o processo de contração muscular de forma genérica, mas para o contexto do trabalho é importante correlacionar a ação das substâncias séricas sobre este processo. Desta forma, nos próximos tópicos destacaremos a ação do cálcio e do fosfato inorgânico sérico no mecanismo contrátil.

4.2 A Ação do Cálcio na Contração Muscular

O cálcio, além das funções de manutenção da integridade óssea, tem papel fundamental para o processo de contração muscular sob sua forma iônica Ca^{2+}. Dentro dos músculos, estes íons ficam armazenados nas cisternas do retículo sarcoplasmático, que são longas invaginações tubulares que se interpõem pelas miofibrilas, sendo

considerados como uma continuação do sarcolema no interior da fibra muscular esquelética [FUCHS et al., 2001] (Figura 4.7).

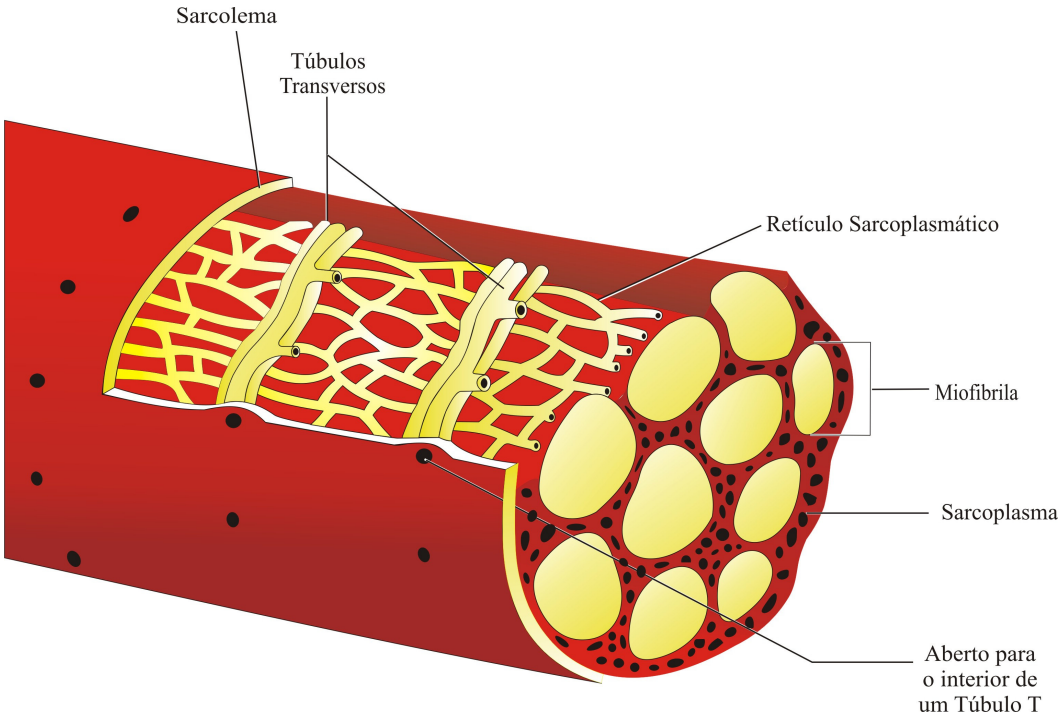

Figura 4.7 *– Os túbulos transversos e o retículo sarcoplasmático de uma fibra muscular [Adaptado de WILMORE et al., 2001, p. 30].*

Os túbulos T atravessam transversalmente a fibra e localizam-se, nos mamíferos, especificamente entre as bandas A e I. Estes túbulos ramificam-se e anastomosam-se dentro do músculo, mantendo associação com o retículo sarcoplasmático e íntimo contato com as bandas A e I [SOELLER et al., 1999; FRIEDRICH et al., 2001].

Esta estrutura, responsável pelo armazenamento do cálcio intracelular, forma uma rede em torno de cada miofibrila e se dispõe sob a forma de cisternas terminais dilatadas a cada junção A-I. Assim, duas dessas cisternas estão sempre em íntima aposição a um túbulo T, formando uma tríade, no qual o túbulo T é flanqueado por duas cisternas [FRIEDRICH et al., 2001].

A organização da fibra muscular esquelética mostra filamentos contráteis dispostos longitudinalmente (miofilamentos) que são de dois tipos distintos: a miosina e a actina [SCOTT et al., 2001].

Os filamentos delgados de actina são formados por quatro proteínas denominadas tropomiosina, troponina, actina G e actina F que medeiam à regulação da contração por meio dos íons Ca^{2+} [EGELMAN, 2001].

A tropomiosina é uma molécula presa à actina de forma espiralada sobre a dupla hélice. A tropomiosina impede a ligação actina/miosina bloqueando o sítio de ligação [MACINTOSH, 2003].

A troponina fica presa à molécula de tropomiosina e é um complexo de três proteínas globulares: Troponina T (troponin T - TnT), que une cada complexo a um sítio específico na molécula de tropomiosina; Troponina C (troponin C - TnC) que liga os íons cálcio e Troponina I (troponin I - TnI) que inibe a interação entre filamentos delgados e espessos [EGELMAN, 2001; FUCHS et al., 2001; STEVENS et al., 2002] (Figura 4.8).

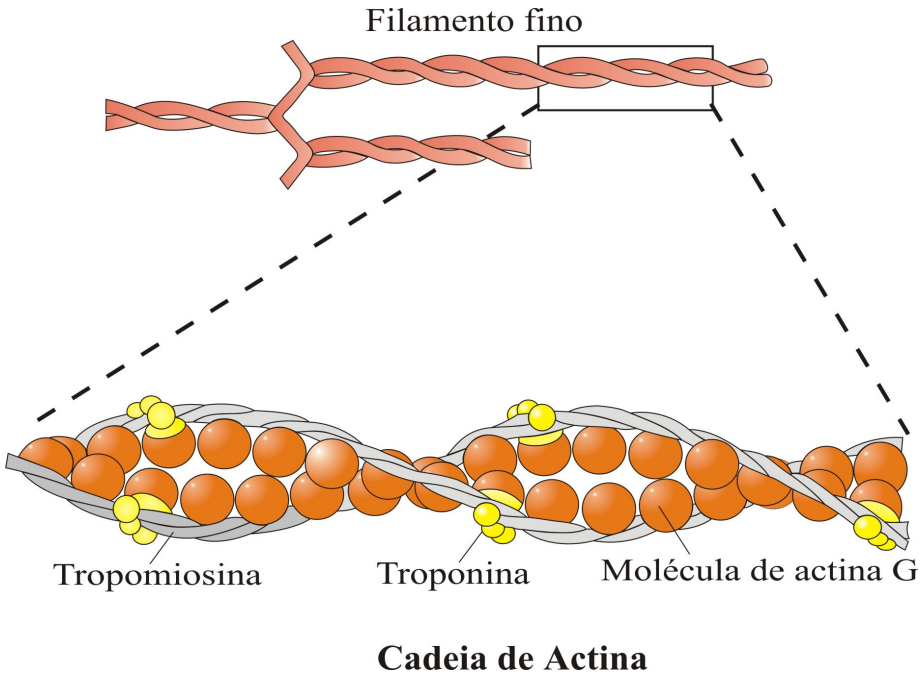

Figura 4.8 *– Filamentos de troponina e tropomiosina*
[Modificado de SILVERTHORN, 2003, p. 349].

A molécula de miosina é formada por uma longa cadeia polipeptídica e tem na sua extremidade a sua cabeça. A miosina pode ser clivada em duas partes distintas: uma parte contendo a sua maior extensão é denominada de meromiosina leve e a parte menor associada com a cabeça é conhecida por meromiosina pesada, sendo este último o

principal para o processo de contração muscular por ter um sítio de ligação a ATP e um sítio de ligação à actina [KRENDEL et al., 2005] (Figura 4.9).

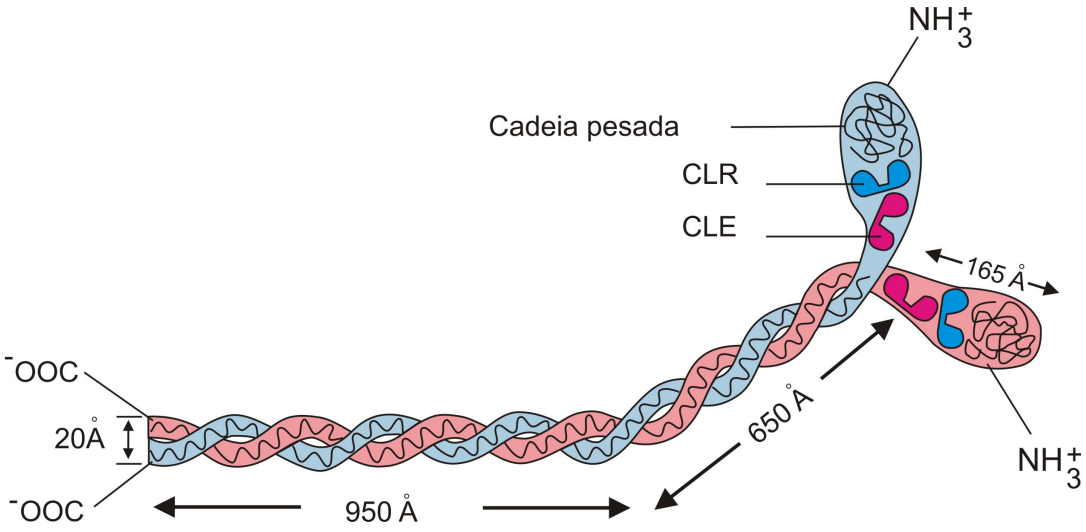

Figura 4.9 *– Divisão da miosina: meromiosina leve e meromiosina pesada [Modificado de VOET et al., 2002, p. 182].*

De acordo com a hipótese dos filamentos deslizantes, o processo de contração ocorre quando a acetilcolina é liberada na fenda sináptica pelo impulso nervoso e provoca a despolarização do sarcolema, dos túbulos T e do retículo sarcoplasmático [WAN et al., 1999; BALOG et al., 2001; KABBARA et al., 2001; ZHANG et al., 2001; MACDONALD et al., 2006]. Esses eventos provocam a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma em torno das miofibrilas. O Ca^{2+} liga-se à subunidade TnC da troponina modificando sua conformação [KABBARA et al., 2001; MACINTOSH, 2003] (Figura 4.10).

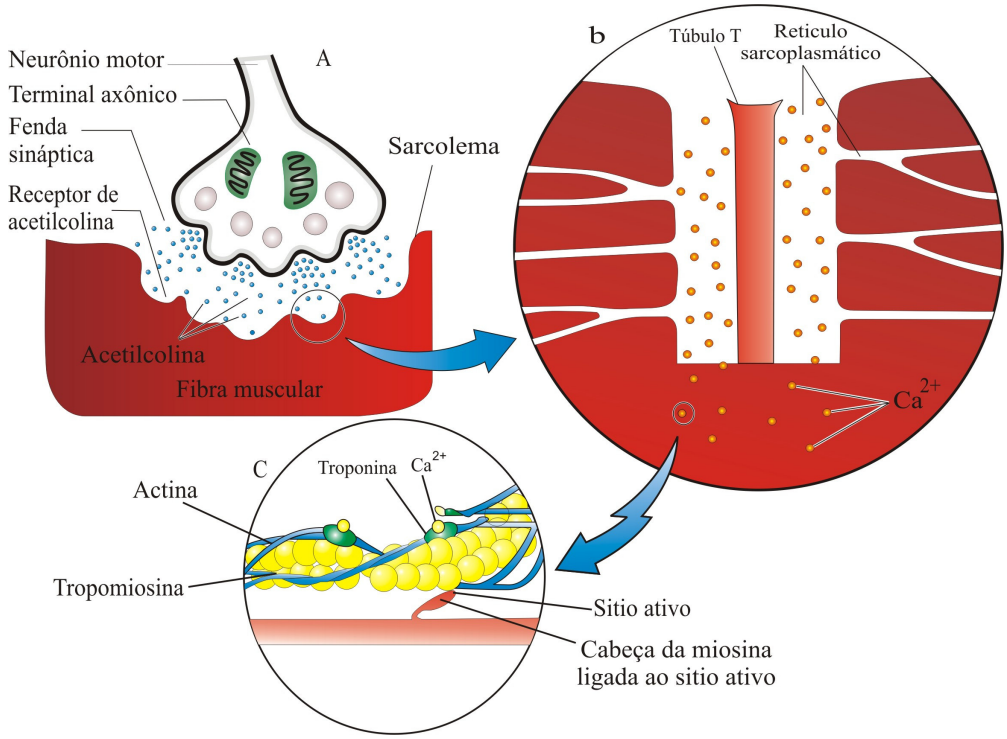

Figura 4.10 *– Seqüência de eventos que levam à contração muscular [Adaptado de WILMORE et al., 2001, p. 35].*

A mudança conformacional na troponina aprofunda a tropomiosima no sulco da actina e libera o seu sítio ativo. A ATP presente na cabeça da miosina é hidrolizado em ADP e Pi. O Pi é liberado, resultando não somente no aumento da força de ligação entre actina e miosina, mas também na alteração conformacional da cabeça de miosina. O ADP é também liberado e o filamento delgado é puxado em direção ao centro do sarcômero (força de contração). Uma nova molécula de ATP se liga à cabeça de miosina levando a uma liberação da ponte entre actina e miosina [IRVING et al., 2000; MACINTOSH, 2003; XIAO et al., 2003; MACDONALD et al., 2006] (Figura 4.11).

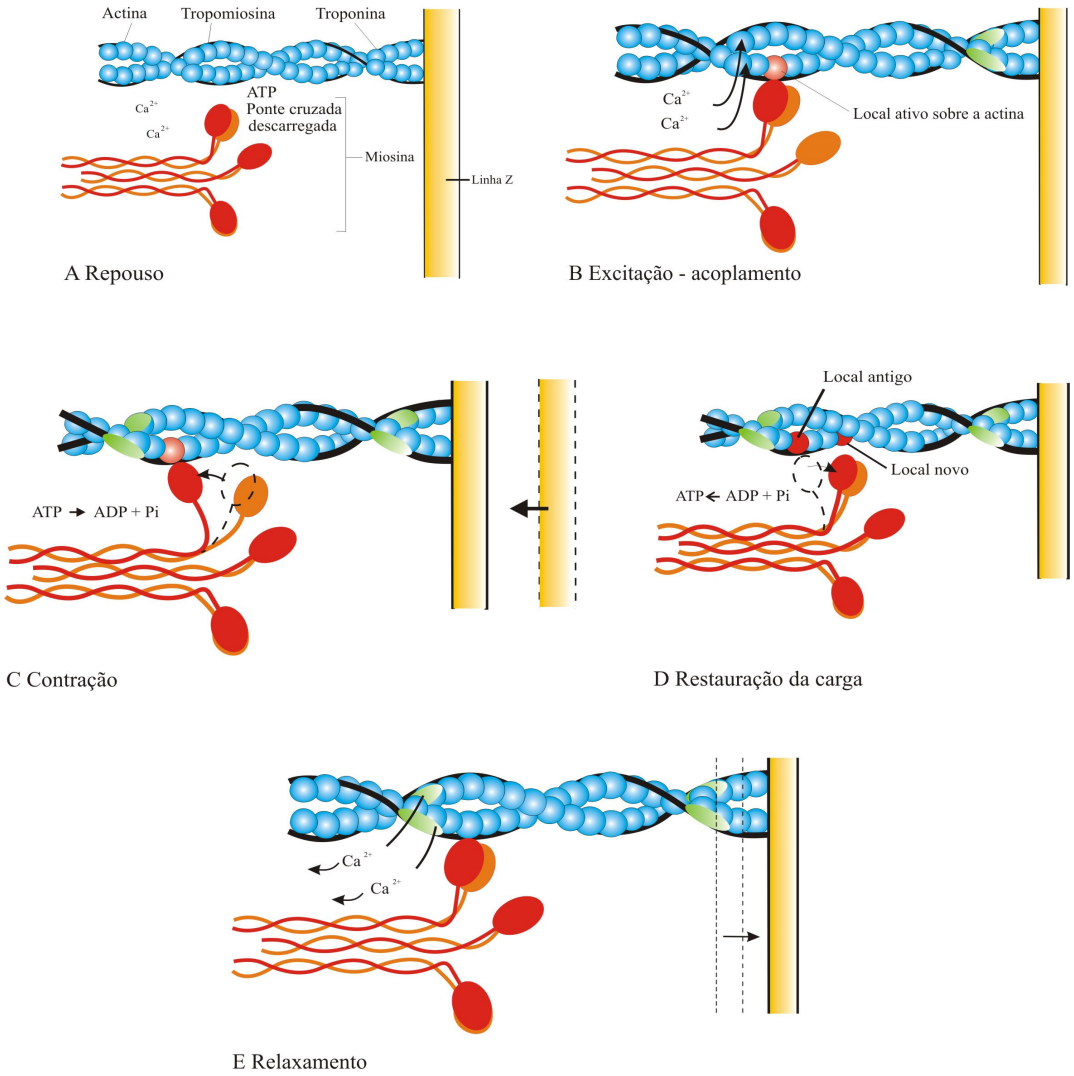

Figura 4.11 *– Pontes cruzadas. Processo de ação do cálcio sobre a actina e a miosina [Adaptado de FOSS et al., 2000, p. 128].*

4.3 A Ação do Fosfato Inorgânico na Contração Muscular

Durante uma contração muscular, sabemos que a miosina interage ciclicamente com a actina em um processo que é potencializado energicamente pela hidrólise da ATP. É conhecido que na transição das pontes cruzadas a geração de força está associada com a liberação de fosfato inorgânico (Pi), resultado da clivagem do ATP

(ADP+Pi), necessário para a ligação e separação das pontes cruzadas [HINKEN et al., 2004] (Figura 4.12).

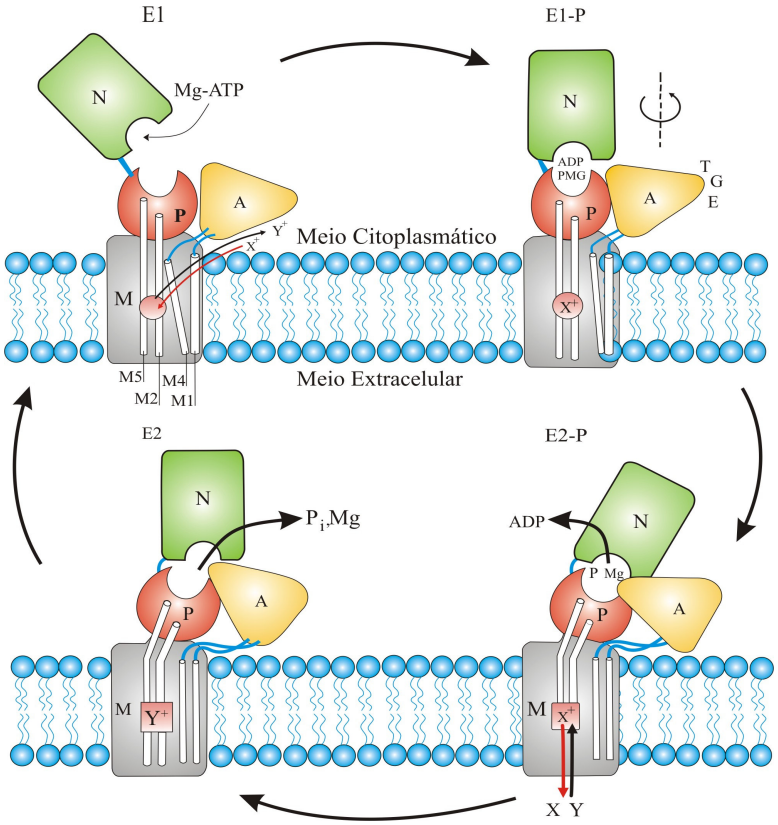

Figura 4.12 *– Diagrama esquemático do ciclo catalítico das ATPases. Destaque para o resultado da hidrólise com a liberação dos íons Mg^{2+} e do fosfato inorgânico (Pi) [Modificado de KÜHLBRANDT, 2004, p. 291].*

As evidências demonstram que o aumento do Pi diminui a força de contração isométrica e conseqüentemente induz uma dificuldade do processo de contração muscular [BALOG et al., 1999; DUKE et al., 2000; STIENEN et al., 2000; TESI et al., 2000; ALLEN et al., 2001; BEAUGE, 2001; COUPLAND et al., 2001; DUKE et al., 2001a; DUKE et al., 2001b; FUKUDA et al., 2001; VAN DER VELDEN et al., 2001; TESI et al., 2002; WESTERBLAD et al., 2002; YAGI et al., 2002; BOSE et al., 2003; HE et al., 2003; DEBOLD et al., 2004; HINKEN et al., 2004].

Durante uma contração muscular repetida, existe uma alteração substancial na concentração de um número importante de metabólitos. A concentração de fosfocreatina pode diminuir próximo de 0, enquanto o fosfato inorgânico (Pi) pode aumentar de 1-5 mM para 30 mM ou mais [DEBOLD et al., 2004]. Outras mudanças também podem

ocorrer, como uma diminuição do pH intracelular de 7,0 para 6,5, ou menos, e uma diminuição da ATP entre 25 a 30% [BALOG et al., 2000].

Existem constatações de que o Pi influencia no mecanismo de ação das pontes-cruzadas devido à diminuição da quantidade de Ca^{2+} liberado pelo retículo sarcoplasmático, observados na presença de uma elevação do Pi [FRUENS et al., 1994; BALOG et al., 2000; DUKE et al., 2000; ALLEN et al., 2001; WESTERBLAD et al., 2002].

Segundo Duke et al. [2001b, p. 418] nas "*fibras musculares esqueléticas ocorre uma redução da liberação de* Ca^{2+} *pelos retículos sarcoplasmáticos durante as fases posteriores de fadiga, induzidas por repetida excitação tetânica*".

Uma observação geral nos modelos estudados para a comprovação da ação do Pi é a dificuldade de isolá-lo nos processos metabólicos musculares sem o aparecimento de outras mudanças metabólicas [BALOG et al., 2000; WESTERBLAD et al., 2002]. Desta maneira, ainda são necessárias metodologias que permitam a análise isolada do processo e a diferenciação dos mecanismos de produção de energia e a contração muscular.

O Pi é originado em dois momentos no metabolismo: no processo de produção de energia, onde o Pi é originado da dissociação da fosfocreatina sob a ação da enzima fosfoquinase e, na contração muscular, através da hidrólise da ATP necessária para o processo de deslizamento das pontes cruzadas, diminuindo a quantidade de liberação de Ca^{2+} [DUKE et al., 2000b] (Figura 4.13).

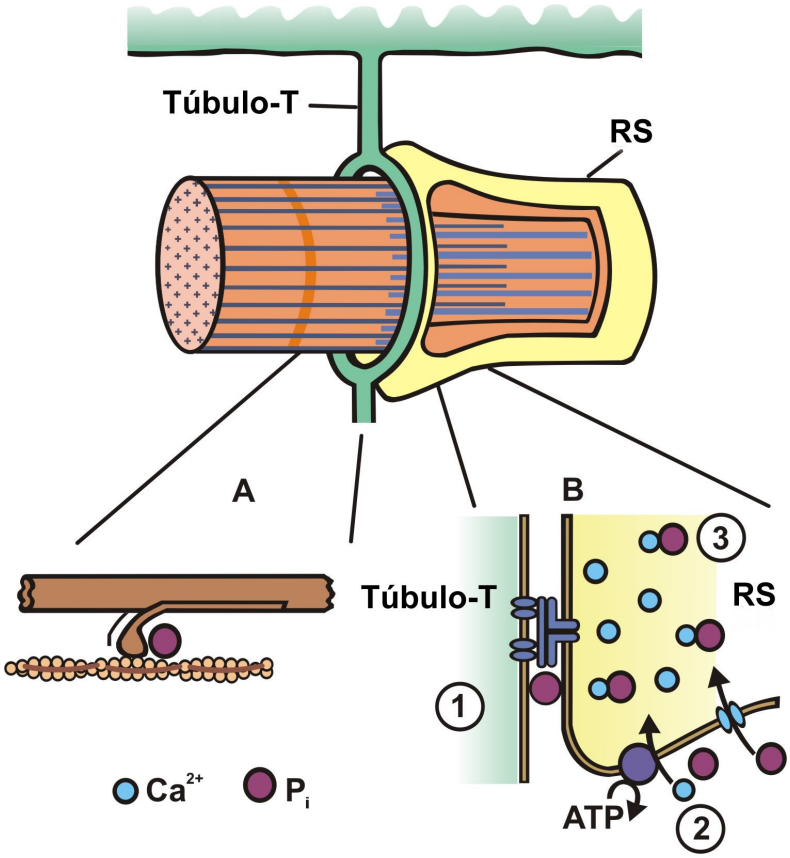

Figura 4.13 *– Figura esquemática que ilustra os locais onde o aumento do Pi pode afetar a função muscular durante a fadiga. O aumento do Pi pode agir diretamente na miofibrila e diminuir a produção de força das pontes cruzadas e a sensibilidade das miofibrilas em relação ao Ca2+ (A). Agir sobre a liberação do Ca2+ no retículo sarcoplasmático (B). O aumento do Pi pode aumentar a tetania na contração muscular pelo: estímulo dos canais de liberação do Ca2+ do retículo sarcoplasmático (1); inibição da captação de ATP do retículo sarcoplasmático (2); e, através da precipitação com Ca2+, diminuir o Ca2+ disponível para liberação (3) [Adaptado de WESTERBLAD et al., 2002, p. 20].*

Entre os autores, não existe consenso de que o Pi atua em todos os níveis de contração muscular e em todos os tipos de fibras, mas são unânimes em afirmar que o fosfato inorgânico atua diretamente na forma de contração, mas tendo poucas influências na velocidade de contração [DUKE et al., 2000; HINKEN et al., 2004]. Nem todas as fibras musculares sofrem influência da concentração de Pi, de acordo com os experimentos, o músculo cardíaco parece ser mais sensível ao Pi do que os músculos esqueléticos [DEBOLD et al., 2004; HINKEN et al., 2004].

4.4 Fosfato de Cálcio

Durante a contração muscular excessiva, os níveis de fosfato inorgânico intracelular podem aumentar significativamente de 1–5 Mm em repouso chegando a 30–40 mM [ALLEN et al., 2001]. Este aumento gera associação com o cálcio sérico e a conseqüente formação de um precipitado denominado fosfato de cálcio [BALOG et al., 2000; DUKE et al., 2000; ALLEN et al., 2001; WESTERBLAD et al., 2002].

Estudos anteriores demonstram que a entrada do Pi no lúmen do retículo sarcoplasmático proporciona a precipitação de fosfato de cálcio, influenciando a quantidade liberada de cálcio necessária para o processo de contração muscular, através da sua aderência a troponina C [BALOG et al., 2000; DUKE et al., 2000; STIENEN et al., 2000; TESI et al., 2000; BEAUGE, 2001; COUPLAND et al., 2001; DUKE et al., 2001a; DUKE et al., 2001b; FUKUDA et al., 2001; VAN DER VELDE et al., 2001; TESI et al., 2002; WESTERBLAD et al., 2002; BOSE et al., 2003; HE et al., 2003; ALLEN et al., 2004; DEBOLD et al., 2004; HINKEN et al., 2004].

O fosfato de cálcio precipitado ficará momentaneamente no meio intracelular e posteriormente irá para a circulação sanguínea onde será eliminado via excreção urinária [GAASBEEK et al., 2005].

O fosfato de cálcio é um sal inorgânico que sofre dissociação em meio aquoso, conforme equação [MOTTA, 2003]:

$$Ca_3(PO_4)_2\ (s) = 3Ca^{2+}\ (aq) + 2PO^{3-}{}_4\ (aq)$$

Este composto é considerado de baixa solubilidade, sendo confirmado pelo seu produto de solubilidade que é da ordem de $2{,}0 \times 10^{-29}$ na temperatura de 25 ^{o}C.

Os aspectos bioquímicos, a absorção, distribuição, excreção e hormônios de influência no fosfato inorgânico e do cálcio, foram descritos no Capítulo 2.

4.5 Conclusão

Observamos que diferentes estruturas são responsáveis pela formação do músculo e a sua importância para o processo de contração muscular.

Concluímos, também, a influência dos íons cálcio e do fosfato inorgânico no processo de contração muscular e, através da precipitação com o cálcio, formando um composto denominado fosfato de cálcio. Esta precipitação influenciará na quantidade de íons cálcio disponível para a troponina C.

No próximo capítulo será abordada a proposta da pesquisa, a descrição dos métodos, procedimentos e a descrição dos equipamentos e drogas utilizadas para atingir o objetivo deste projeto.

Capítulo 5

Metodologia

Este capítulo aborda o material e método, as drogas e reagentes utilizados para a anestesia e aumento da concentração de fosfato inorgânico sérico nos animais, a técnica cirúrgica e o método de análise bioquímica da creatinina, uréia, cálcio e fosfato inorgânico. Contudo, a maior ênfase será dada na análise do cálcio e do fosfato inorgânico, uma vez que este é o ponto central deste trabalho.

5.1 Material e Método

5.1.1 Animais

Os animais utilizados na pesquisa foram ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), originários e mantidos no Biotério da Faculdades Cathedral de Ensino Superior, em conformidade com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, conforme protocolo nº 020 (Anexo B).

Os animais foram mantidos sob alimentação e água *ad libitum*, sendo alojados em gaiolas de polietileno branco com dimensões de 42x24x17cm, com no máximo 5 animais por gaiola, sob condições de iluminação controlada, com ciclo claro/escuro com duração de 12/12 horas, além de aclimatizados e com higienização diária.

Os animais foram ambientados no laboratório durante um período de, pelo menos, 1 h antes do experimento e com a finalidade de minimizar as variações circadianas, todos os experimentos foram conduzidos sempre entre 13:00 e 17:00 h [MORIN, 1993].

Para o desenvolvimento da pesquisa, os animais tiveram a seguinte formação:

- fator sexo: o grupo foi formado apenas por machos;

- fator peso: os animais foram pesados antecipadamente com uma balança Bioprecisa BS 300 A (Empresa Eletronic Balance - max: 3.000 g; d = 0,1 g; e= 10 d), onde obtivemos o peso corpóreo variando entre 150 a 250 gramas.

- fator idade: idade média de 90 a 120 dias, evitando diferenças de maturação morfológica.

Foram considerados como critério de exclusão os animais velhos ou muito jovens ou que apresentassem alguma doença que pudessem alterar a capacidade energética ou contráctil. Para as análises bioquímicas foram excluídas amostras sanguíneas hemolisadas.

5.1.2 Drogas e Reagentes

As seguintes drogas e reagentes foram utilizados: Fosfato de Potássio (potassium phosphate - K_3PO_4) 10 mL – 2 mEq/mL (Darrow® Laboratório S.A); Anestésico Tiopental Sódico 70 mg/kg (Anental®); Cálcio, método colorimétrico de ponto final (Quibasa – Química Básica do Brasil - Marca Bioclin®); Fósforo, método colorimétrico de ponto final (Quibasa – Química Básica do Brasil - Marca Bioclin®); Creatinina, método colorimétrico de ponto final (Quibasa – Química Básica do Brasil - Marca Bioclin®); Uréia, método enzimático colorimétrico (Quibasa – Química Básica do Brasil - Marca Bioclin®).

O objetivo da utilização do fosfato de potássio para aumento da quantidade de fosfato inorgânico nos animais é devido a sua ampla utilização para o controle da hipofosfatemia [MILLER et al., 2000; SHELDON, 2004; TAYLOR et al., 2004].

Considerando que uma dose utilizada para o tratamento da hipofosfatemia administrada em um organismo normal resultará na ocorrência de hiperfosfatemia, teremos um aumento dos níveis plasmáticos de fosfato inorgânico. Levando em conta que o cálcio e o fosfato inorgânico apresentam atratividade, este aumento propiciará a formação do fosfato de cálcio.

Nos itens abaixo, serão apresentadas os locais e as doses onde estas drogas e reagentes serão utilizados.

5.1.3 Grupos

Os animais foram separados aleatoriamente e distribuídos em sete grupos iguais de 7 animais, Grupo I (controle – administração de soro fisiológico), Grupo II (K_3PO_4 - 0,5 mg/kg), Grupo III (K_3PO_4 - 1,5 mg/kg), Grupo IV (K_3PO_4 - 2,5 mg/kg), Grupo V (K_3PO_4 - 5,0 mg/kg), Grupo VI (K_3PO_4 - 7,5 mg/kg) e o Grupo VII (K_3PO_4 - 10,0 mg/kg).

Na Tabela 5.1 estão relacionadas informações sobre o grupo, quantidade de animais, droga, via de administração (intraperitoneal) e a dose injetada.

A diferença entre os grupos está na quantidade de fosfato de potássio que será administrada, via injeção rápida, anteriormente a coleta das amostras sanguíneas nos grupos II, III, IV, V, VI e VII.

No grupo controle foi injetado 0,5 ml de soro fisiológico (NaCl 0,9%). O objetivo desta utilização é reproduzir as mesmas condições dos outros grupos no momento da aplicação da injeção, não tendo efeito nas dosagens bioquímicas.

O grupo controle é utilizado para efeito de comparação entre os outros grupos, sendo que marcadamente a única diferença entre eles eram as concentrações de fosfato de potássio administradas. Dessa forma, as alterações nos parâmetros analisados não poderiam ser atribuídas à manipulação animal ou as características do veículo utilizado para administração da droga.

Tabela 5.1 – Distribuição do grupo, quantidade de animais, droga, via de administração e o volume injetado.

Grupo	Droga	Dose Injetado
Controle	soro fisiológico (0,5 ml)	-
II	K_3PO_4	0,5 mg/kg
III	K_3PO_4	1,5 mg/kg
IV	K_3PO_4	2,5 mg/kg
V	K_3PO_4	5,0 mg/kg
VI	K_3PO_4	7,5 mg/kg
VII	K_3PO_4	10,0 mg/kg

n = 7 animais por grupo

Via de administração = intraperitoneal (i.p.)

5.2 Procedimentos

5.2.1 Administração da droga

Após 10 minutos da administração intraperitoneal do soro fisiológico (grupo controle) e do fosfato de potássio (distribuição conforme a Tabela 5.1), os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de anestésico Tiopental sódico 70 mg/kg (Anental®). Os animais foram considerados anestesiados após ter sido constatada a perda de reação aos estímulos mecânicos provocado por preensão na cauda.

O tempo de espera de 10 minutos para o início da técnica cirúrgica foi baseado em um experimento prévio, onde foi verificado que este período foi suficiente para apresentar variações nas concentrações séricas cálcio, fosfato inorgânico, uréia e creatinina após a injeção de doses diferentes de fosfato de potássio.

A Figura 5.1 destaca a via de administração intraperitoneal utilizada para a administração do soro fisiológico, do fosfato de potássio e do anestésico em todos os animais [BLOUIN et al., 2000].

5.2.2 Técnica Cirúrgica

Os animais foram colocados sobre uma bandeja metálica, em decúbito dorsal horizontal, com imobilização dos membros pélvicos e torácicos por meio de fita adesiva.

Foi realizada a incisão longitudinal mediana da região abdominal com uma tesoura fina com secção da pele, tela subcutânea e linha aponeurótica mediana de aproximadamente 8 cm, com exposição e afastamento lateral das alças intestinais para a direita, para visualização da veia cava inferior para a retirada de sangue venoso (Figuras 5.2, 5.3 e 5.4).

Figura 5.1 *– Fotografia mostrando injeção pela via intraperitoneal, utilizado para a administração do soro fisiológico, do fosfato de potássio e do anestésico*

Figura 5.2 *– Fotografia mostrando a abertura da cavidade abdominal, visando a retirada do sangue, através da veia cava inferior, para análise.*

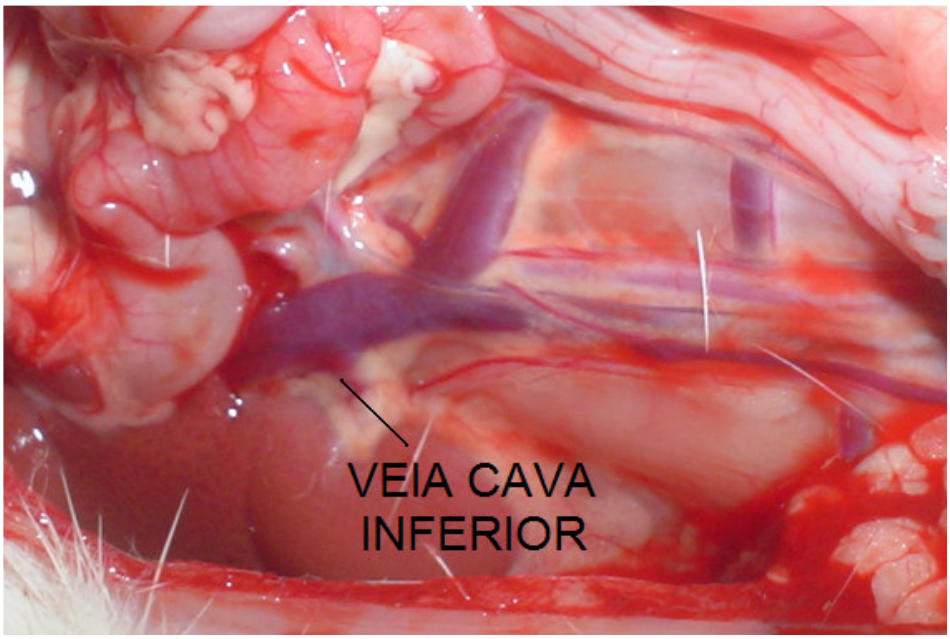

Figura 5.3 *- Fotografia mostrando a veia cava inferior.*

Figura 5.4 *– Fotografia mostrando a retirada do sangue da veia cava inferior.*

O sangue coletado foi condicionado em tubos sem coagulante para o exame bioquímico e centrifugados para a obtenção do soro (Centrífuga Sorológica Marca Bio Eng® Modelo BE-5000 nº 1616).

Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por meio de secção do músculo diafragmático.

O soro foi separado da porção celular do sangue até vinte minutos após a coleta, evitando a troca iônica entre ambos devido ao aumento da permeabilidade das hemácias ao cálcio [BIOCLIN, 2006a] e devido à liberação de fosfato hemático [BIOCLIN, 2006b] que poderiam interferir no resultado da análise bioquímica.

5.2.3 Análise Bioquímica da Creatinina, Uréia, Cálcio e Fosfato Inorgânico

As avaliações sanguíneas de uréia, creatinina, cálcio e fosfato inorgânico foram realizadas em triplicada, onde os valores bioquímicos representam as quantidades séricas das substâncias. As tabelas, que compõe o Anexo A, apresentam os valores em triplicata, a média de cada animal e média dos grupos, das dosagens séricas de uréia, creatinina, fosfato inorgânico e cálcio.

As substâncias bioquímicas analisadas no experimento foram: creatinina, uréia, cálcio e fosfato inorgânico, onde no Grupo I (Controle) encontramos resultados semelhantes aos de referência para ratos Wistar [CATHY, 1996] e observamos similaridade também aos valores humanos [HENRY, 1999].

5.2.4 Dosagem Bioquímica

As amostras sanguíneas foram analisadas através das seguintes metodologias laboratoriais.

5.2.4.1 Creatinina

Marca: Bioclin®

Objetivo: Teste colorimétrico *in vitro* para determinação de creatinina.

Princípio: A creatinina reage com ácido pícrico formando um complexo de cor amarelo-avermelhado (Figura 5.6). Nesse pH ocorre a máxima formação do complexo corado creatinina-picrato e com outros elementos plasmáticos. Com a adição do reagente ácido, o pH é diminuído e a cor da creatinina é desfeita, permanecendo a cor devida aos cromogênios [HENRY, 1999]. Por diferença entre as leituras obtidas em pH alcalino e no ácido, obtém-se o valor real da creatinina.

Técnica

1. Marcar 3 tubos de ensaio: B (Branco), A (Amostra) e P (Padrão).
2. Pipetar 2,0 ml do reagente alcalino nos tubos B, A e P.
3. Adicionar 250 µl de água destilada no tubo B.
4. Adicionar 250 µl da Amostra (soro) no tubo A.
5. Adicionar 250 µl do Padrão no tubo P.
6. Adicionar 500 µl de ácido pícrico nos tubos B, A e P.
7. Homogeneizar os tubos e incubar em banho-maria a 37°C por 10 min.
8. Ler as absorbâncias dos tubos A e P (A1) em filtro de 510 nm acertando o zero com o Branco (B).
9. Adicionar 100 µl do reagente ácido no Branco e na Amostra.
10. Homogeneizar e aguardar 5 min. em temperatura ambiente.
11. Ler a absorbância A2 da Amostra (A) em filtro de 510 nm, acertando o zero com o Branco (B).

Cálculos

Creatinina (mg/dl) = (A1-A2/Absor. padrão) x 3. Como a reação segue a Lei de Lambert-Beer, o método do fator de calibração pode ser usado: fator de calibração = concentração do padrão (3 mg/ml) / Absor. Padrão, logo a creatinina (mg/dl) é igual a (A1-A2) x fator de calibração.

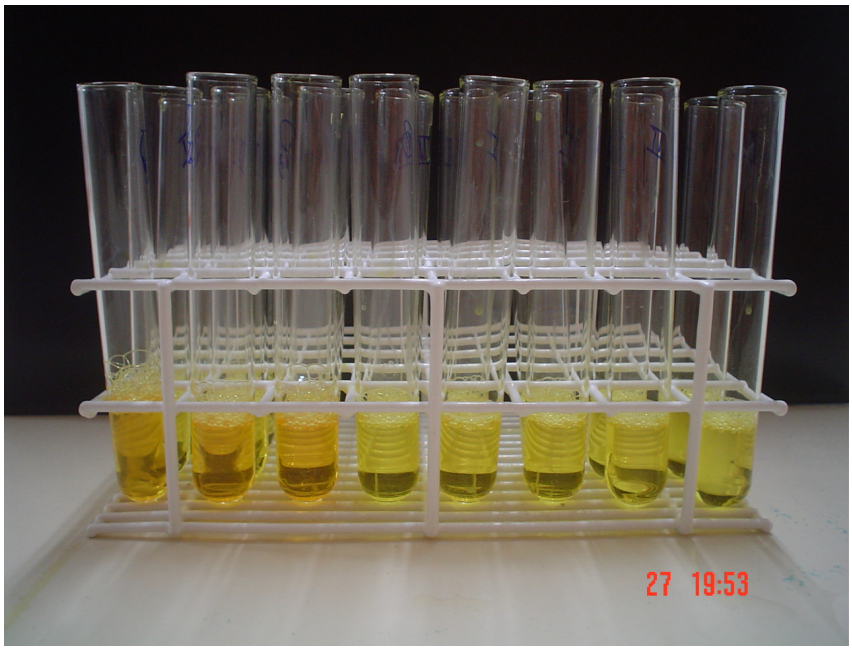

Figura 5.5 *– Fotografia mostrando o teste colorimétrico in vitro para determinação de creatinina.*

5.2.4.2 Fosfato Inorgânico

Marca: Bioclin®

Objetivo: Teste colorimétrico *in vitro* para a determinação do fosfato inorgânico.

Princípio: A determinação do fosfato inorgânico é feita por colorimetria a partir da reação do fosfato inorgânico com o molibdato de amônio, formando fosfomolibidato de amônio que posteriormente é reduzido a azul de molibdênio, cuja intensidade de cor desenvolvida é proporcional à concentração do fosfato inorgânico presente na amostra [CANÇADO, 2001] (Figura 5.7).

Técnica

1. Marcar 3 tubos de ensaio: B (Branco), A (Amostra) e P (Padrão).
2. Pipetar 2,5 ml de água destilada nos tubos B, A e P.
3. Adicionar 100 µl da Amostra (soro) no tubo A.
4. Adicionar 100 µl do Padrão no tubo P.

5. Adicionar 1 gota do reagente redutor nos tubos B, A e P.

6. Adicionar 1 gota do reagente molibdato nos tubos B, A e P.

7. Homogeneizar os tubos e aguardar 2 min. em temperatura ambiente.

8. Adicionar o regente alcalino nos tubos B, A e P.

9. Agitar os tubos e deixar em repouso em temperatura ambiente por 5 minutos cronometrados.

10. Efetuar as leituras das absorbâncias do Padrão (P) e da Amostra (A) em espectrofotômetro utilizando filtro de 650 nm., acertando o zero com o Branco (B).

Cálculos

Fosfato (mg/ml) = (Absor. amostra / Absor. padrão) x 5. Como a reação segue a Lei de Lambert-Beer, o método do fator de calibração pode ser usado:

Fator de calibração = Concentração do padrão (5 mg/ml) / Absor. Padrão, logo o fosfato (mg/dl) é igual a Absor. da amostra x Fator de calibração.

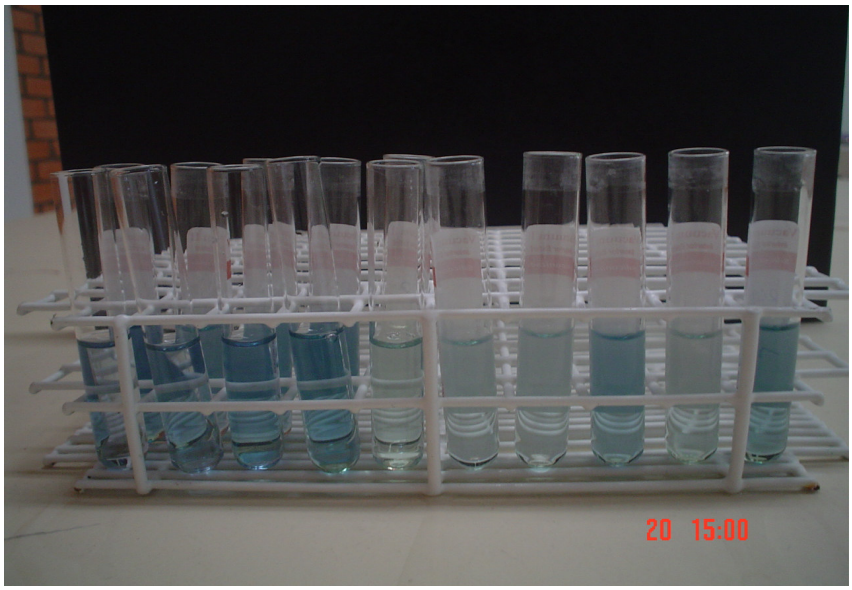

Figura 5.6 *– Fotografia mostrando o teste colorimétrico in vitro para determinação de fosfato inorgânico.*

5.2.4.3 Cálcio

Marca: Bioclin®

Objetivo: Teste colorimétrico *in vitro* para determinação do cálcio.

Princípio: A determinação do cálcio é feita por colorimetria através da medição da intensidade de cor produzida pelo composto formado entre a orto-cresolftaleína complexona e o cálcio em pH alcalino (Figura 5.8) [CANÇADO, 2001].

Técnica

1. Marcar 3 tubos de ensaio: B (Branco), A (Amostra) e P (Padrão).
2. Pipetar 1,0 ml do reagente tampão nos tubos B, A e P.
3. Adicionar 1,0 ml do reagente de cor nos tubos B, A e P.
4. Adicionar 20 µl da Amostra (soro) no tubo A.
5. Adicionar 20 µl do Padrão no tubo P.
6. Homogeneizar e ler as absorbâncias do Padrão (P) e da Amostra (A) em espectrofotômetro utilizando filtro de 578 nm, zerando o aparelho com o Branco (B).

Cálculo

Cálcio (mg/dl) = (Absor. amostra / Absor. padrão) x 10. Como a reação segue a Lei de Lambert-Beer, o método do fator de calibração pode ser usado:

Fator de calibração = Concentração do padrão (10 mg/ml) / Absor. Padrão, logo o cálcio (mg/dl) é igual a Absor. da amostra x Fator de calibração.

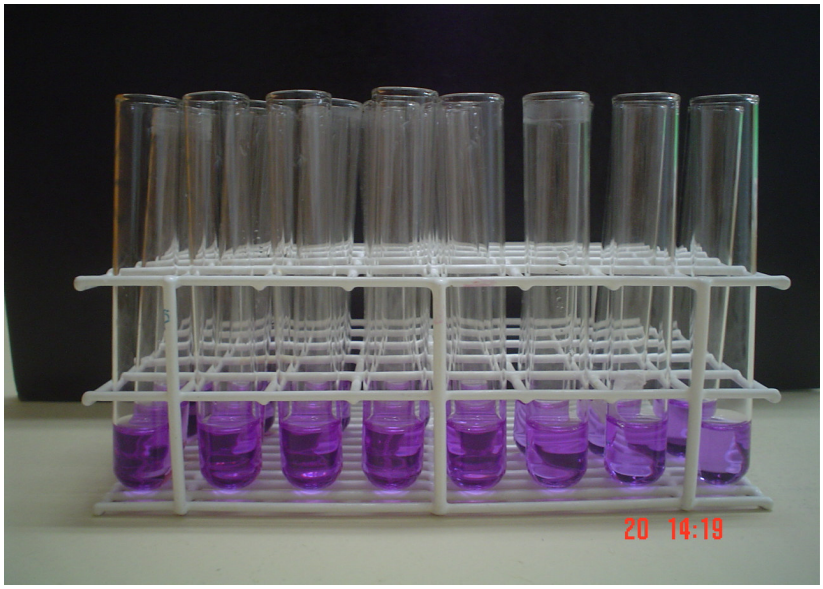

Figura 5.7 *– Fotografia mostrando o teste colorimétrico in vitro para determinação de cálcio.*

5.2.4.4 Uréia

Marca: Bioclin

Objetivo: Teste enzimático colorimétrico para determinação *in vitro* da uréia.

Princípio: A uréia é hidrolisada a íons amônio e CO2 pela urease ►Uréia + 3H20 ►2 NH4+ + CO2 + 2 OH -. Em pH alcalino e na presença de salicilato e hipoclorito de sódio, amônia reage dando origem a um composto esverdeado cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da uréia na amostra (Figura 5.9) [HENRY, 1999].

Técnica

1. Marcar 3 tubos de ensaio: B (Branco), A (Amostra) e P (Padrão).
2. Pipetar 10 µl da amostra (soro) no tubo A.
3. Adicionar 10 µl do Padrão no tubo P.
4. Adicionar 1,0 ml do reagente de trabalho (uma parte da enzima para 20 partes do tampão) nos tubos B, A e P.
5. Homogeneizar os tubos e colocar em banho-maria a 37°C por 5 min.

6. Adicionar 1,0 ml do oxidante de trabalho nos tubos B, A e P.

7. Homogeneizar e manter em banho-maria a 37°C por mais 5 min.

8. Ler a absorbância do tubo A e P em espectrofotômetro em filtro de 600 nm, acertando o zero com o Branco (B).

Cálculo

Uréia (mg/dl) = (Absor. amostra / Absor. padrão) x 70. Como a reação segue a Lei de Lambert-Beer, o método do fator de calibração pode ser usado:

Fator de calibração = Concentração do padrão (70 mg/ml) / Absor. Padrão, logo o uréia (mg/dl) é igual a Absor. da amostra x Fator de calibração.

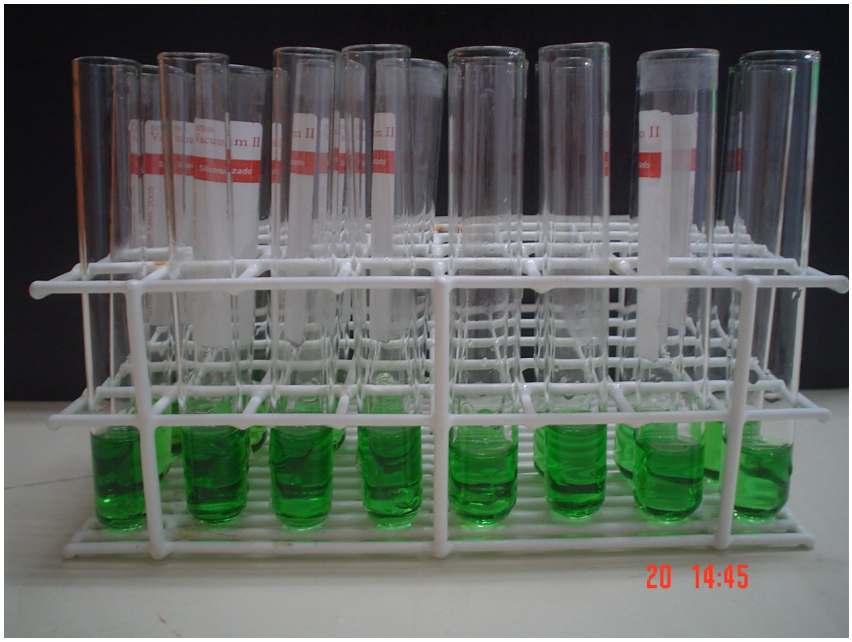

Figura 5.8 *– Fotografia mostrando o teste colorimétrico in vitro para determinação de uréia.*

Para análise da uréia, os tubos de ensaio foram imersos em Banho-Maria (Marca Bioplus® IT 2002 BMI) por 05 (cinco) mantidos a 37 graus.

Após o preparo das soluções foi utilizado para análise do valor da absorbância dos padrões e das amostras o Espectrofotômetro (Modelo E-225-D).

5.3 Conclusão

Neste capítulo descrevemos os materiais e métodos da pesquisa, a descrição dos animais, o critério de divisão dos grupos, assim como, as drogas e os reagentes utilizados para a anestesia, para o aumento da concentração sérica do fosfato inorgânico e análise bioquímica da creatinina, uréia, cálcio e do fosfato inorgânico.

No próximo capítulo, será apresentada a análise estatística dos resultados das avaliações e as médias dos grupos após os experimentos descritos acima, assim como, os dados ajustados a modelos lineares e não lineares a fim de representar a relação entre as variáveis analisadas sob a forma de um modelo estatístico.

Capítulo 6

Resultados

Este capítulo apresenta a análise estatística dos experimentos descritos no Capítulo 5, tendo como objetivo verificar se a administração de fosfato de potássio, em diferentes doses variando de 0,0 a 10,0 mg/kg, proporcionou uma alteração na concentração sérica da uréia, creatinina, cálcio e fosfato inorgânico. As tabelas do Anexo A demonstram os valores em triplicata, a média de cada animal e média dos grupos verificados na análise bioquímica dos animais avaliados

6.1 Material e Métodos

Os modelos lineares [1-2] e não lineares [3-5] foram utilizados para ajustar os dados a fim de representar a relação entre as variáveis analisadas sob a forma de um modelo (Tabela 6.1).

Tabela 6.1 – *Representação dos modelos lineares e não lineares.*

[1]	Linear	$y_i = y_0 + ax$
[2]	Quadrático	$y_i = y_0 + ax + bx^2$
[3]	Exponencial negativo	$y_i = ae^{-bx}$
[4]	Exponencial negativo três parâmetros	$y_i = y_0 + ae^{-bx}$
[5]	Sigmoidal com quatro parâmetros	$y_i = y_0 + \dfrac{a}{1 + e^{-\left[\frac{x - x_0}{b}\right]}}$

Cada um daqueles modelos deve ser aplicado em consonância com os dados e com os objetivos da análise. Assim, antes de se iniciar qualquer avaliação é importante analisar os modelos, através dos seguintes critérios: a) lógica biológica, onde norteia o objetivo, a natureza, a extensão do estudo e o resultado esperado; b) a significância do ajuste do modelo aos dados; c) o valor do coeficiente de determinação (R^2).

Assim, nos casos em que, eventualmente, mais de um modelo puder ser ajustado – expressar uma relação funcional entre as variáveis estudadas e permitir a estimativa de parâmetros que possam determinar essa relação – serão considerados, para a seleção do modelo, o coeficiente de determinação e a lógica biológica expressa pelo mesmo, de forma que a escolha seja, além de estatisticamente correta, aquela que possa ser explicada biologicamente de forma adequada [LWANGA et al., 1991].

Com relação à lógica biológica em uma análise estatística, o tipo de resultado deve ser levado em consideração e, nesta pesquisa, o resultado biológico esperado é a influência do aumento da administração do fosfato de potássio sobre a concentração sérica de cálcio, a partir de uma determinada dose ideal para que este efeito possa ser atingido.

Segundo a metodologia de análise de dados proposta por Fisher [GUIMARÃES, 2004] onde considera, no seu desenvolvimento e aplicação, as seguintes suposições: normalidade da variável; independência de erros e homocedasticidade (homogeneidade de variância). Assim, como premissas para as análises paramétricas, realizou-se, para cada variável, a análise dos dados segundo o seguinte procedimento:

a) Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov [ZAR, 1999];
b) Teste de homocedasticidade (F máximo) de Hartley [HOFFMAN et al., 1998];
c) Análise de regressão para todos os modelos lineares e não-lineares;
d) Construção de um gráfico demonstrando (ou não) o ajuste do modelo selecionado aos dados.

Conforme se pode observar nas Tabelas 6.2, 6.5, 6.8, e 6.11 e, em seguida, nas Tabelas 6.3, 6.6, 6.9 e 6.12, todos os dados possuem função de distribuição de probabilidade normal e homogeneidade de variância, respectivamente.

6.2 Análise dos Dados da Uréia

6.2.1 Teste de Normalidade

Tabela 6.2 – *Freqüência dos valores de uréia observados e esperados, e resultado (D) do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) de função de distribuição de probabilidade normal, com indicação do nível de significância (p).*

Uréia	Observado		Esperado	
(mg/dl)	Freqüência	Percentual	Freqüência	Percentual
(49-50]	1	2,04082	0,19665	2,04344
(50-51]	0	0,00000	1,19688	0,00000
(51-52]	8	16,32653	4,42879	16,34752
(52-53]	8	16,32653	9,97619	16,34752
(53-54]	11	22,44898	13,69196	22,47784
(54-55]	13	26,53061	11,45357	26,56472
(55-56]	8	16,32653	5,83854	16,34752
(56-57]	0	0,00000	1,81233	0,00000
(57-58]	0	0,00000	0,34216	0,00000
	K-S	**D= 0,11963**	**p<0,20**	

6.2.2 Teste de Homocedasticidade

Tabela 6.3 – *Valores médios e desvios padrão de uréia, nas diferentes concentrações de fosfato inorgânico e teste de homocedasticidade de Hartley (F máximo), com indicação do nível de significância (p).*

Fosfato Inorgânico (mg/kg)	Uréia (mg/dl)	Desvio Padrão	
0	53,6667	±1,1056	
0,5	54,1429	±1,4383	
1,5	53,3333	±1,5031	Fmax=2,2987
2,5	54,0000	±1,6216	p<0,1803
5	53,5238	±1,6762	
7,5	53,4286	±1,4105	
10	53,3809	±1,3392	
Total	53,6395	±1,4421	

Observa-se, pelos resultados obtidos nas Tabelas 6.2 e 6.3, que os dados para uréia apresentam função de distribuição de probabilidade normal e homogeneidade de variância. Assim, podemos proceder à análise de regressão para ajuste dos modelos apresentados na Tabela 6.1, cujos resultados podem ser vistos na Tabela 6.4.

Tabela 6.4 – *Parâmetros dos modelos de regressão ajustados.*

Modelos de Regressão	y_0	a	b	x_0	R^2	$R^2_{aj.}$	p
Linear	53,8215	-0,0472			0,3172	0,1806	0,1880
Quadrático	53,8284	-0,0537	0,0007		0,3176	0,0000	0,4656
Exponencial negativo		53,8217	0,0009		0,3172	0,1807	0,1880
Exponencial negativo três parâmetros	51,5839	2,2434	0,0235		0,3176	0,0000	0,4657
Sigmoidal quatro parâmetros	53,4048	0,3809	-0,1336	4,8946	0,3470	0,0000	0,6917

Observa-se que nenhum dos modelos foi estatisticamente significativo (todos os valores de p são superiores a 5%) para representar alguma variação de uréia em função das doses de fosfato inorgânico.

A Figura 6.1 representa a média de uréia sérica dos experimentos com diferentes doses de fosfato de potássio. Novamente, não se observam diferenças significativas na concentração de uréia para as diferentes doses de fosfato de potássio ($p \leq 0,05$).

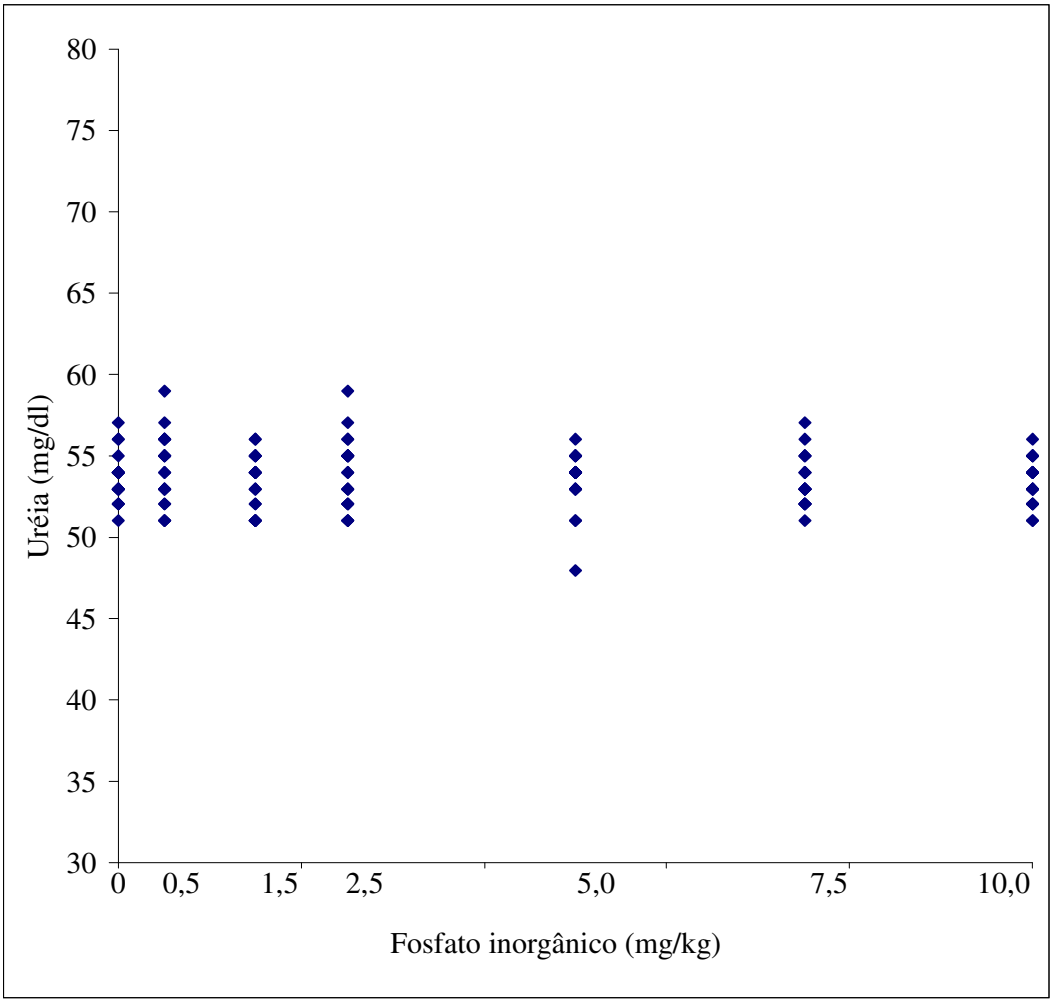

Figura 6.1 – *Relação entre os níveis de fosfato inorgânico (mg/kg) e uréia (mg/dl).*

6.3 Análise dos Dados da Creatinina

6.3.1 Teste de Normalidade

Tabela 6.5 – *Freqüência dos valores de creatinina observados e esperados, e resultado (D) do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) de função de distribuição de probabilidade normal, com indicação do nível de significância (p).*

Creatinina	**Observado**		**Esperado**	
(mg/dl)	**Freqüência**	**Percentual**	**Freqüência**	**Percentual**
(0,42-0,44]	2	4,08163	0,32438	4,24754
(0,44-0,46]	2	4,08163	1,31910	4,24754
(0,46-0,48]	2	4,08163	3,78585	4,24754
(0,48-0,50]	3	6,12245	7,67130	6,37131
(0,50-0,52]	9	18,36735	10,97749	19,11393
(0,52-0,54]	19	38,77551	11,09494	40,35162
(0,54-0,56]	8	16,32653	7,92020	16,99016
(0,56-0,58]	4	8,16327	3,99283	8,49508
(0,42-0,44]	2	4,08163	0,32438	4,24754
	K-S	**D=0,16510**	**p<0,15**	

6.3.2 Teste de Homocedasticidade

Tabela 6.6 – *Valores médios e desvios padrão de creatinina, nas diferentes concentrações de fosfato inorgânico e teste de homocedasticidade de Hartley (F máximo), com indicação do nível de significância (p).*

Fosfato Inorgânico (mg/kg)	Creatinina (mg/dl)	Desvio Padrão	
0	0,5152	±0,0509	
0,5	0,5152	±0,0154	
1,5	0,5176	±0,0522	Fmax=4,25
2,5	0,5324	±0,0213	p<0,10
5	0,5071	±0,0362	
7,5	0,5152	±0,0154	
10	0,5414	±0,0197	
Total	**0,5206**	**±0,0302**	

Observa-se, pelos resultados destacados nas Tabelas 6.5 e 6.6, que os dados referentes à concentração de creatinina apresentam função de distribuição de probabilidade normal e homogeneidade de variância e, dessa forma, pode-se proceder à análise de regressão para ajuste dos modelos apresentados na Tabela 6.1, cujos resultados podem ser vistos na Tabela 6.7.

Tabela 6.7 – *Parâmetros dos modelos de regressão ajustados.*

Modelo de Regressão	y_0	a	b	x_0	R^2	$R^2_{aj.}$	p
Linear	0,5151	0,0014			0,2068	0,0481	0,3053
Quadrático	0,5206	-0,0038	0,0005		0,4068	0,1102	0,3519
Exponencial negativo		0,5206	2,8723e-13		0,0000	0,0000	1,0000
Exp. negativo três parâmetros	39,4624	-38,9473	3,6713e-5		0,2067	0,0000	0,6292
Sigmoidal quatro parâmetros	0,5171	1,2734	0,1560	10,6146	0,5956	0,1911	0,3791

Observa-se que nenhum dos modelos utilizados foi estatisticamente significativo (todos os valores de p superiores a 5%) para representar alguma variação de creatinina em função das doses de fosfato inorgânico.

A Figura 6.2 (a seguir) representa a média de creatinina sérica para os experimentos com diferentes doses de fosfato de potássio. Não foram encontradas diferenças significativas entre as dosagens ($p \leq 0,05$), ou seja, a quantidade de fosfato inorgânico (nos limites utilizados) não altera a concentração de creatinina no sangue.

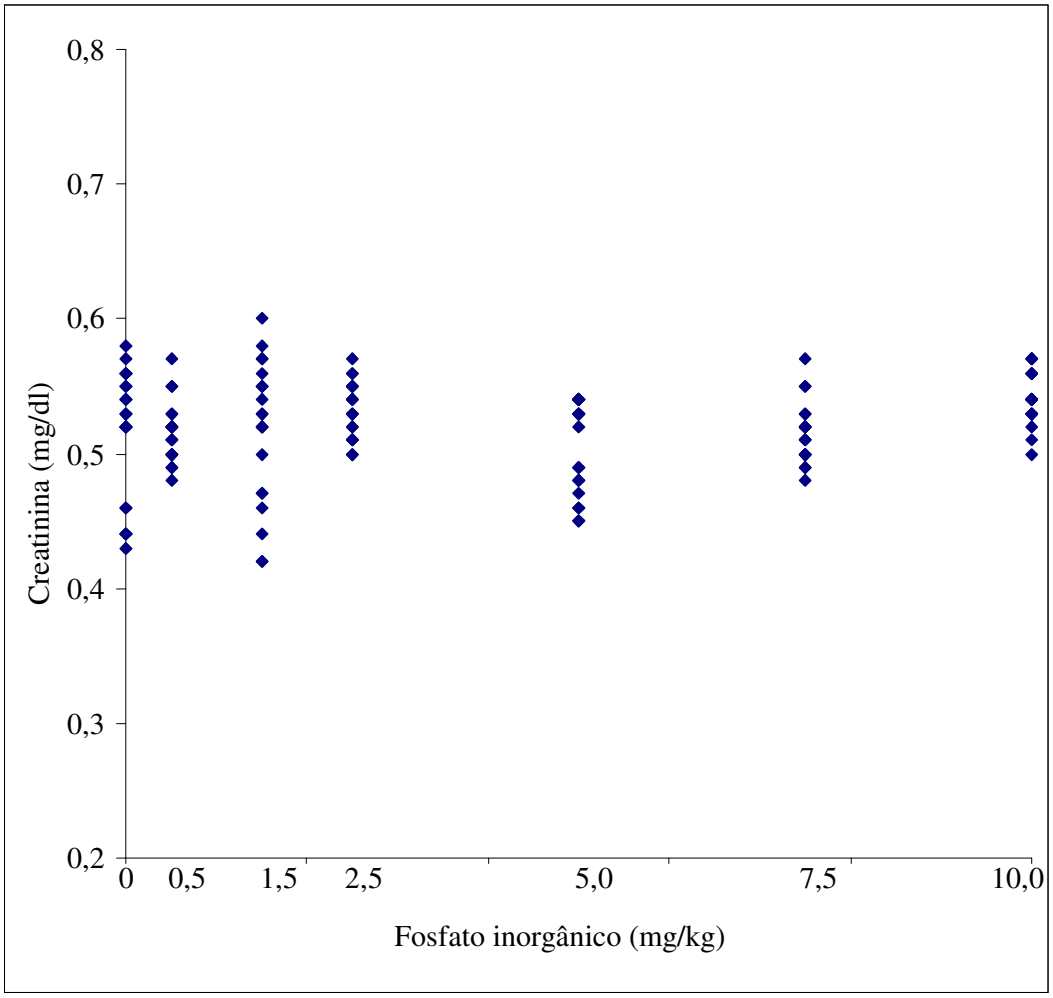

Figura 6.2 – *Relação entre os níveis de fosfato inorgânico (mg/kg) e creatinina sérica (mg/dl).*

6.4 Análise dos Dados do Fosfato Inorgânico

6.4.1 Teste de Normalidade

Tabela 6.8 – *Freqüência dos valores de fosfato inorgânico observados e esperados, e resultado (D) do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) de função de distribuição de probabilidade normal, com indicação do nível de significância (p).*

Fosfato	**Observado**		**Esperado**	
(mg/dl)	**Freqüência**	**Percentual**	**Freqüência**	**Percentual**
(3,0-3,5]	1	2,04082	0,206682	2,11949
(3,5-4,0]	1	2,04082	0,690783	2,11949
(4,0-4,5]	3	6,12245	1,836176	6,35847
(4,5-5,0]	2	4,08163	3,882070	4,23898
(5,0-5,5]	5	10,20408	6,528613	10,59745
(5,5-6,0]	5	10,20408	8,733943	10,59745
(6,0-6,5]	11	22,44898	9,294901	23,31438
(6,5-7,0]	10	20,40816	7,869137	21,19489
(7,0-7,5]	11	22,44898	5,299681	23,31438
(7,5-8,0]	0	0,00000	2,839192	0,00000
	K-S	**D=0,167401**	**p<0,15**	

6.4.2 Teste de Homocedasticidade

Tabela 6.9 – *Valores médios e desvios padrão de fosfato inorgânico, nas diferentes concentrações de fosfato inorgânico e teste de homocedasticidade de Hartley (F máximo), com indicação do nível de significância (p).*

Fosfato Inorgânico (mg/kg)	Fosfato sérico (mg/dl)	Desvio Padrão	
0	4,7238	±1,0935	
0,5	5,0952	±0,7887	
1,5	6,1048	±0,4511	Fmax=5,87
2,5	6,8238	±0,6253	p<0,10
5	7,0619	±0,1615	
7,5	6,4857	±0,5534	
10	6,6571	±0,4756	
Total	**6,1361**	**±0,5927**	

Observa-se, pelos resultados destacados nas Tabelas 6.8 e 6.9, que os dados apresentam função de distribuição de probabilidade normal e homogeneidade de variância. Podemos então, proceder à análise de regressão para ajuste dos modelos apresentados na Tabela 6.1, cujos resultados podem ser vistos na Tabela 6.10.

Tabela 6.10 – *Parâmetros dos modelos de regressão ajustados.*

Modelo de Regressão	y_0	a	b	x_0	R^2	$R^2_{aj.}$	p
Linear	5,5244	0,1586			0,4495	0,3394	0,0993
Quadrático	4,9466	0,7037	-0,0562		0,8381	0,7571	0,0262
Exponencial negativo		6,1361	6,9672e-13		0,0000	0,0000	1,0000
Exp. Negativo três parâmetros	6,7899	-2,2069	0,8456		0,9217	0,8825	0,0061
Sigmoidal quatro parâmetros	4,5916	2,1767	0,4361	1,0860	0,9574	0,9148	0,0147

De acordo com a Tabela 6.10 e com os critérios definidos anteriormente para seleção do modelo mais adequado, observa-se que o modelo quadrático, o modelo exponencial negativo de três parâmetros e o modelo sigmoidal de quatro parâmetros apresentam um excelente grau de ajuste aos dados ($p<5\%$). Entretanto, se for considerada a variação dos dados devido ao modelo ajustado em relação à variação total, expressa pelo R^2, percebe-se que este último permite um melhor ajuste.

É importante notar que o modelo de regressão sigmoidal é o que apresenta a melhor lógica biológica, uma vez que permite explicar de forma coerente o comportamento observado dos níveis de fosfato inorgânico sérico, pois mesmo a quadrática apresentando melhores resultados, a curva plotada não representaria a diminuição da concentração do cálcio influenciada pelo aumento da concentração de fosfato inorgânico sérico, visto que a representação gráfica da curva do modelo quadrático mostrou uma tendência a aumentar em razão da dose, não expressando a reação biológica de diminuição ou manutenção da concentração do cálcio.

A Figura 6.3 representa a média de fosfato inorgânico sérico durante os períodos experimentais sob diferentes doses de fosfato de potássio. É possível observar o aumento da concentração de fosfato inorgânico sérico mediante o aumento das doses de fosfato inorgânico até a dose de 2,5 mg/kg, onde foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre as doses. A partir desse valor há uma tendência à estabilização da resposta apresentada devido à absorção máxima do fosfato de potássio pelo organismo, a partir da qual não se observam diferenças estatisticamente significante entre o grupo controle e as doses de fosfato de potássio, de acordo com o que será apresentado na Tabela 6.14.

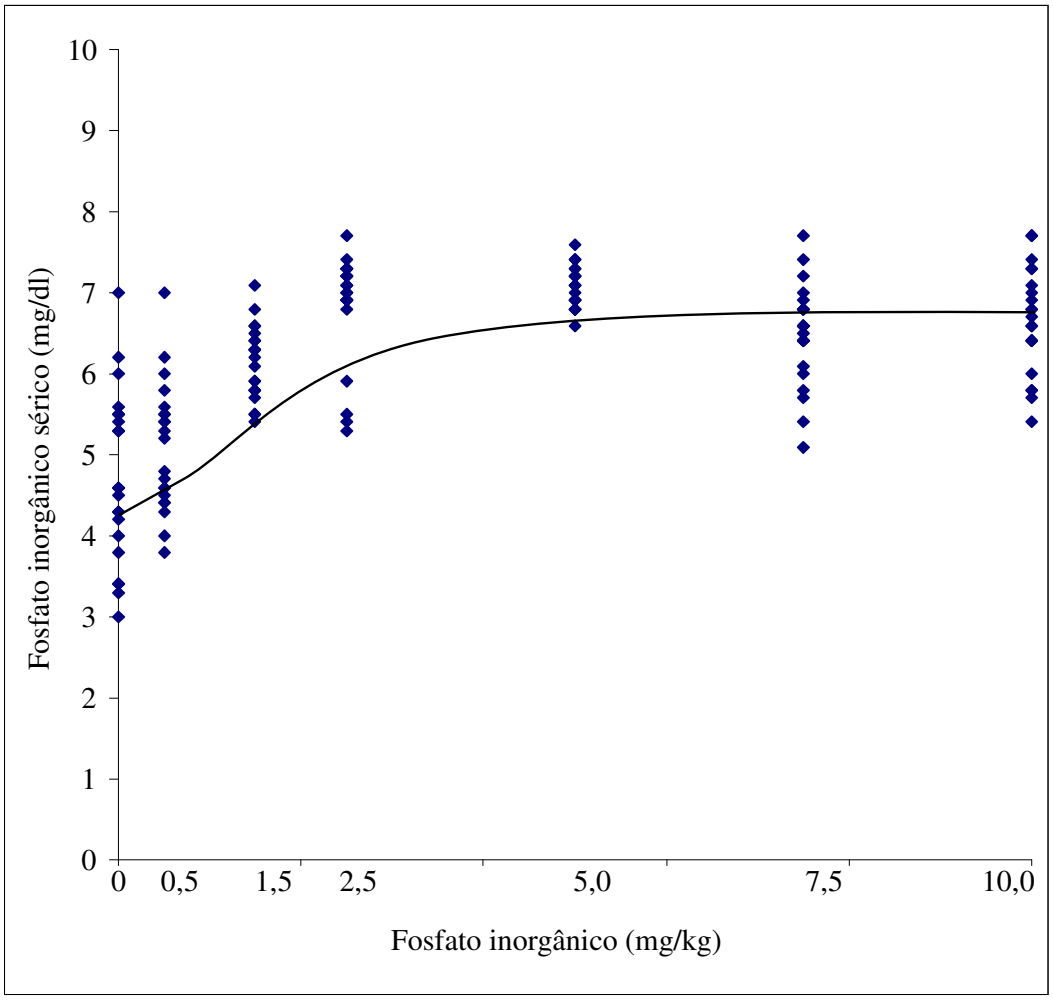

Figura 6.3 – *Relação entre os níveis de fosfato inorgânico (mg/kg) e fosfato sérico (mg/dl) e a linha de tendência caracterizando um sigmoidal de quatro parâmetros.*

6.5 Análise dos Dados do Cálcio

6.5.1 Teste de Normalidade

Tabela 6.11 – *Freqüência dos valores de cálcio observados e esperados, e resultado (D) do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) de função de distribuição de probabilidade normal, com indicação do nível de significância (p).*

Cálcio	**Observado**		**Esperado**	
(mg/dl)	**Freqüência**	**Percentual**	**Freqüência**	**Percentual**
(4-5]	7	14,28571	3,97353	8,31060
(5-6]	12	24,48980	9,58091	20,03838
(6-7]	8	16,32653	13,83103	28,92745
(7-8]	11	22,44898	11,95961	25,01340
(8-9]	9	18,36735	6,19321	12,95303
(9-10]	2	4,08163	1,91913	4,01384
(10-11]	0	0,00000	0,35540	0,74331
	K-S	**D=0,12569**	**p<0,20**	

6.5.2 Teste de Homocedasticidade

Tabela 6.12 – *Valores médios e desvios padrão de cálcio, nas diferentes concentrações de fosfato inorgânico e teste de homocedasticidade de Hartley (F máximo), com indicação do nível de significância (p).*

Fosfato Inorgânico (mg/kg)	Cálcio sérico (mg/dl)	Desvio Padrão	
0	8,7333	±0,3805	
0,5	7,9857	±0,5577	
1,5	7,3619	±0,3263	Fmax=2,9220
2,5	6,7714	±0,5394	p<0,1382
5	5,2238	±0,5287	
7,5	5,3714	±0,5148	
10	5,5667	±0,4018	
Total	**6,7163**	**±0,4642**	

Observa-se, pelos resultados obtidos, constantes nas Tabelas 6.11 e 6.12, que os dados apresentam função de distribuição de probabilidade normal e homogeneidade de variância e, dessa forma, pode-se proceder à análise de regressão para ajuste dos modelos apresentados na Tabela 6.1, cujos resultados podem ser vistos na Tabela 6.13.

Tabela 6.13 – *Parâmetros dos modelos de regressão ajustados.*

Modelo de Regressão	y_0	a	b	x_0	R^2	$R^2_{aj.}$	p
Linear	7,9430	-0,3180			0,7579	0,7095	0,0108
Quadrático	8,6239	-0,9604	0,0662		0,9841	0,9761	0,0003
Exponencial negativo		8,1247	0,0539		0,8090	0,7708	0,0058
Exp. negativo três parâmetros	5,2387	3,5702	0,4046		0,9629	0,9444	0,0014
Sigmoidal quatro parâmetros	5,3532	4,0662	-1,1411	1,5231	0,9744	0,9489	0,0069

De acordo com a Tabela 6.13 e com os critérios definidos anteriormente para seleção do modelo mais adequado, observa-se que todos os modelos testados apresentam um excelente grau de ajuste aos dados ($p<5\%$). Ao ser considerada a variação dos dados devido ao modelo ajustado em relação à variação total dos dados, expressa pelo R^2, percebe-se que o modelo quadrático expressa um melhor ajuste. Entretanto, como a maior lógica biológica reside no fato de existir uma estabilização da precipitação do cálcio com o fosfato inorgânico, e esse é o principal critério de seleção de um modelo que possa expressar a relação observada, o único modelo que atende aos critérios definidos é o modelo de regressão sigmoidal, uma vez que permite explicar de forma coerente o comportamento observado dos níveis de cálcio em razão da variação dos níveis de fosfato inorgânico, conforme descrito na análise de regressão para ajuste dos modelos do fosfato inorgânico.

A Figura 6.4 representa a média de cálcio sérico para os experimentos com diferentes doses de fosfato de potássio. Nesta Figura é possível observar a diminuição da concentração sérica de cálcio mediante o aumento das doses de fosfato inorgânico até a dose de 5,0 mg/kg, onde encontramos diferenças estatisticamente significante entre as doses. A partir desse valor há uma tendência à estabilização da resposta apresentada, onde não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre o controle e as doses de fosfato de potássio de acordo com o que será apresentado na Tabela 6.14 ($p \geq 0,05$).

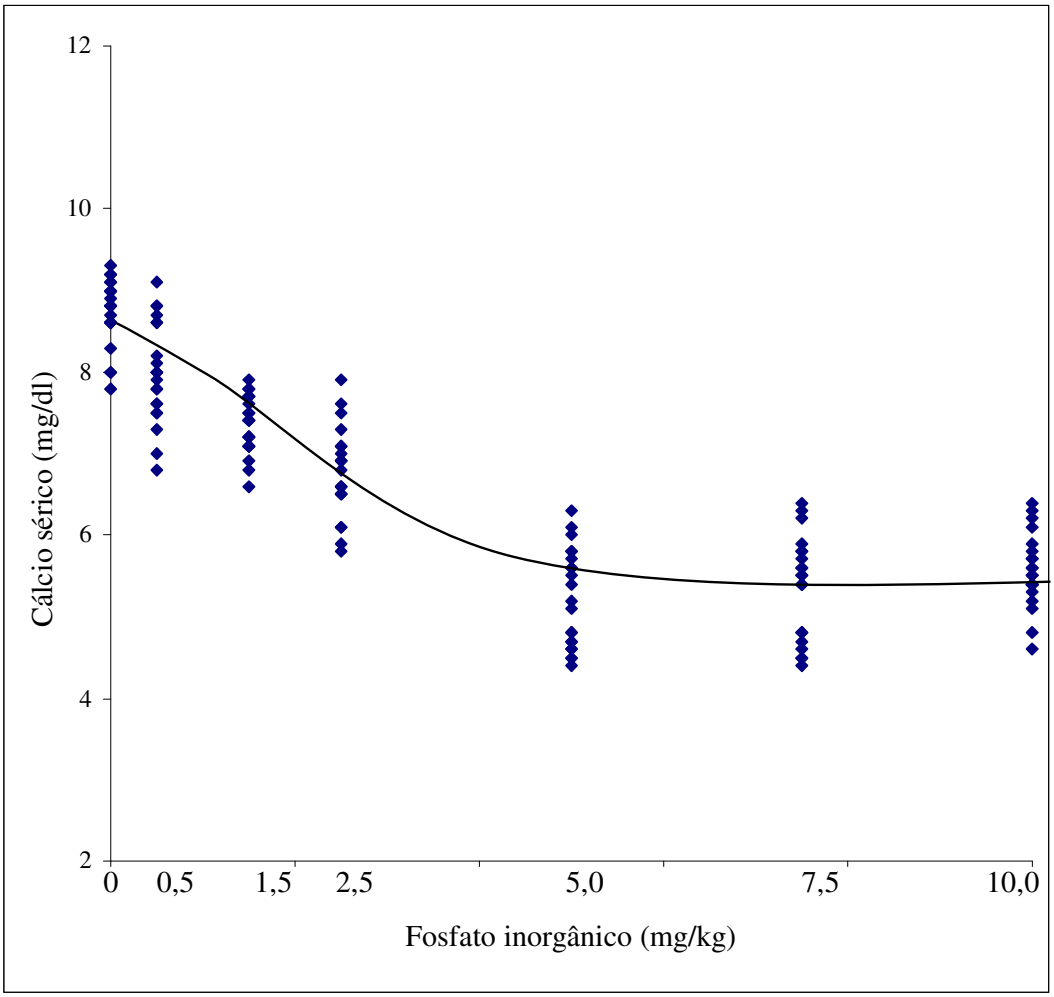

Figura 6.4 – *Relação entre os níveis de fosfato inorgânico (mg/kg) e cálcio sérico (mg/dl) e a linha de tendência caracterizando um sigmoidal de quatro parâmetros.*

6.6 Análise da Relação entre a Concentração Sérica de Fosfato Inorgânico e Cálcio

Tabela 6.14 – *Comparação de médias de fosfato sérico e cálcio sérico nas diferentes doses de fosfato inorgânico, com o teste de Tukey.*

Fosfato Inorgânico (mg/kg)	Fosfato sérico (mg/dl)		Fosfato Inorgânico (mg/ kg)	Cálcio Sérico (mg/dl)	
0,0	4,72	c	0,0	8,73	a
0,5	5,10	c	0,5	7,99	b
1,5	6,10	b	1,5	7,36	c
2,5	6,82	a	2,5	6,77	d
5,0	7,06	a	5,0	5,22	e
7,5	6,49	ab	7,5	5,37	e
10,0	6,66	ab	10,0	5,57	e
Análise de Variância					
g.l.	(7;140)		g.l.	(7;140)	
QM (Efeito)	805,0826		QM (Efeito)	981,6625	
QM (Erro)	0,4807		QM (Erro)	0,2762	
F	1674,716		F	3553,770	
P	***		P	***	

Valores precedidos de mesma letra, na vertical, não diferem significativamente, segundo o teste de Tukey, no nível de 5%.
g.l. = graus de liberdade
Q.M. = Quadrado Médio
F = Valor do teste F
*P = Nível de significância (*** = altamente significativo)*

Observa-se pelos testes comparativos de médias (Tabela 6.14) que, com relação ao fosfato inorgânico sérico, não existe diferença estatisticamente significativa, ao nível de 5%, entre as doses de 2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 7,5 mg/kg e 10,0 mg/kg. Em relação ao cálcio sérico, observa-se que, estatisticamente, não há diferença significativa entre as doses 5,0 mg/kg, 7,5 mg/kg e 10 mg/kg de fosfato inorgânico. Estes resultados corroboraram com aqueles apresentados nas Figuras 6.3 e 6.4.

Na Tabela 6.14, apresenta-se as médias de fosfato sérico sob diferentes níveis de fosfato inorgânico, sendo que as letras *a*, *b* e *c* correspondem às diferenças significativas entre o grupo controle e as doses de fosfato inorgânico. Dessa maneira, as médias dos resultados apresentados pelo grupo controle e a dose 0,5 mg/kg (marcado com a letra *c*), não diferem significativamente. As doses 1,5, 7,5 e 10,0 mg/kg (contendo a letra *b*) não diferem significativamente e, finalmente, as de 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/kg (contendo a letra *a*) também não diferem significativamente entre si, mas diferem entre as doses 0,0 e 1,5 mg/kg, indicando que a quantidade de fosfato sérico estabilizou a partir da dose 2,5 mg/kg, conforme o que se pode observar na Figura 6.3.

Apresenta-se, também, as médias de cálcio, sob os diferentes níveis de fosfato inorgânico, onde as letras *a*, *b*, *c*, *d* e *e* correspondem às diferenças significativas entre o grupo controle e as doses de fosfato inorgânico. Dessa maneira, as médias dos resultados apresentados pelo grupo controle (marcado com a letra *a*) diferem significativamente das doses de fosfato inorgânico injetada. Este resultado também é observado pelas doses 0,5, 1,5 e 2,5 (respectivamente com as letras *b*, *c* e *d*) onde não apresentam resultados significantes comparados com as outras doses. A partir da dose 5,0 mg/kg, comparado com as doses 7,5 e 10,0 mg/kg (todos marcados com a letra *e*) não observamos diferenças estatisticamente significativamente entre as doses, mas são diferentes do controle. Nota-se que, a concentração de cálcio sérico se estabilizou a partir da dose de 5,0 mg/kg de fosfato inorgânico injetada, também destacado visualmente na Figura 6.4.

Finalmente, na Figura 6.5, pode-se observar a diferença que existe entre o grupo controle e o grupo que corresponde à aplicação de 5,0 mg/kg de fosfato potássio, em relação à resposta obtida do cálcio sérico. A Figura 6.5 demonstra a que a dose de 5,0 mg/kg é a dose ideal para conseguir a menor concentração de cálcio sérico. Isto está de acordo com os objetivos propostos, pois a pesquisa tem como finalidade a validação de um modelo experimental que permite inferências a este respeito.

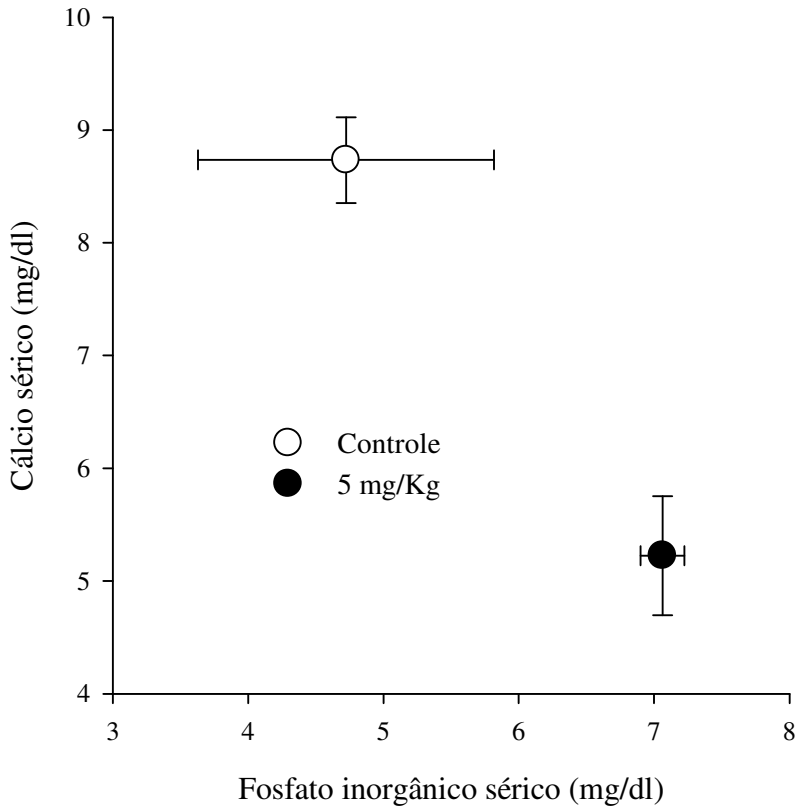

Figura 6.5 – *Diferença entre a dose de 0,0 mg/kg de fosfato inorgânico (controle) e a dose de 5,0 mg/kg, sobre cálcio sérico, e seus respectivos desvios padrão.*

6.7 Conclusão

Neste capítulo apresentamos a análise estatística dos resultados das avaliações e as médias dos grupos após os experimentos, assim como, os dados ajustados a modelos lineares e não lineares a fim de representar a relação entre as variáveis analisadas sob a forma de um modelo estatístico.

No próximo capítulo, discutiremos os resultados das análises estatísticas e apresentaremos pesquisas anteriores que diferem ou que possam corroborar com este trabalho.

Capítulo 7

Discussão

Durante a contração muscular, a miosina interage ciclicamente com a actina em um processo que é controlado energicamente pela hidrólise da ATP. Os eventos bioquímicos (glicólise, fosforilação, hidrólise do ATP, etc.) e mecânicos (liberação dos sítios ativos da actina, movimento das pontes cruzadas, etc.), assim como as substâncias séricas que auxiliam ou interferem neste processo de contração, como o cálcio, creatinina, magnésio, potássio, sódio, entre outros [DAHLSTEDT et al., 2000; ALLEN et al., 2001; WESTERBLAD et al., 2002; SYKES, 2003; BARTHEL et al., 2007] têm sido investigados ao longo dos anos e utilizados para explicar diferentes fenômenos, levando-se em conta a questão central da pesquisa, a variável primária definida, o tipo de resposta esperada e o tipo de análise estatística que se pretende realizar [LWANGA et al., 1991].

Nas pesquisas com objetivo de analisar a diminuição na qualidade da contração e/ou da força muscular, os metabólitos mais frequentemente estudados são o ácido lático e os íons hidrogênio, que levam as alterações do pH produzidas pela acidose; e a relação do fosfato inorgânico e o cálcio, influenciando na ligação do Ca^{2+} com a subunidade TnC da troponina (troponina C) e consequentemente diminuindo a liberação dos sítios ativos da actina.

Alguns estudos sobre a fibra muscular mostram que a acidose pode reduzir a força isométrica e a velocidade de contração [BRUTON et al., 1998; BROOKS, 2001;

FUKUDA et al., 2001; FRASER et al., 2005]. Entretanto, algumas pesquisas observaram que a diminuição da função de contração nem sempre está relacionada diretamente com a diminuição do pH [DUKE et al., 2001b; GLADDEN, 2001; GLADDEN, 2004]. Esses autores concluiram que esta relação nem sempre é diretamente proporcional, e, consequentemente, sugeriram não haver uma relação causal entre a acidose e a produção da força de contração muscular.

Duke [2001b], Gladden [2001], Westerblad [2002], Gladden [2004] e Kristensen [2005] analisaram a relação da temperatura com o efeito da acidose sobre a força, sendo que os resultados indicaram que a acidose tem efeito direto sobre a contração muscular apenas em determinadas temperaturas. Os autores observam que a acidose tem pouco efeito sobre a contração muscular em temperaturas fisiológicas, ou seja, se a diminuição da força muscular está relacionado com a acidez, este efeito também seria observado em temperaturas fisiológicas.

Jubrias et al. [2003] relacionaram a diminuição da contração muscular pela inibição de enzimas relacionadas à glicólise, tais como a fosforilase e a fosfofrutoquinase na presença de acidose, o que levaria à diminuição da produção de energia em forma de ATP. Entretanto, a inibição destas enzimas pela acidose muscular, também não foi observada em temperaturas fisiológicas, ou seja, se existe uma correlação positiva entre a acidose e a inibição enzimática da fosforilase e da fosfofrutoquinase, este efeito também seria observado em temperaturas fisiológicas [GLADDEN, 2004].

Posterino et al. [2001] também estudou o efeito da acidose diminuindo a liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático. Entretanto, Gladden [2004] questionou o efeito depressivo sobre a ação do Ca^{2+} proveniente do retículo sarcoplasmático, não encontrando relação entre a acidose e a diminuição da atividade do Ca^{2+} intracelular.

Nos últimos anos, a relação do fosfato inorgânico com o cálcio tem ganhado importância devido à atuação do Ca^{2+} no processo de contração muscular, através da regulação da contração por meio dos filamentos delgados de actina, particularmente sobre um sítio específico na molécula de TnC que liga os íons cálcio permitindo a interação dos filamentos contráteis [EGELMAN, 2001; FUCHS et al., 2001; STEVENS et al., 2002].

Evidências demonstram a influência do fosfato inorgânico sobre a contração muscular através de sua precipitação com o cálcio e consequente formação de um sal denominado fosfato de cálcio, promovendo a redução dos níveis do cálcio iônico disponíveis para a sua aderência com a troponina C [BALOG et al., 2000; DUKE et al., 2000; STIENEN et al., 2000; TESI et al., 2000; ALLEN et al., 2001; BEAUGE, 2001; COUPLAND et al., 2001; DUKE et al., 2001a; DUKE et al., 2001b; FUKUDA et al., 2001; VAN DER VELDEN et al., 2001; TESI et al., 2002; WESTERBLAD et al., 2002; YAGI et al., 2002; BOSE et al., 2003; HE et al., 2003; DEBOLD et al., 2004; HINKEN et al., 2004].

A análise bioquímica da concentração sérica do cálcio tem importância não apenas para o processo de contração muscular, mas também para o funcionamento e controle de diversos órgãos internos, através do controle e manutenção das atividades vitais. Um exemplo é o aumento da disponibilidade de cálcio extracelular nas fibras musculares cardíacas influenciando a força de contração [BAILEY et al., 1990; SHIELS et al., 1997; BERS, 2002].

A variação da força de contração deve envolver um número variável de pontes cruzadas entre os filamentos finos de actina e os filamentos grossos de miosina, o qual irá requerer a ligação de quantidades variáveis de íons cálcio às proteínas contráteis, particularmente à TnC. Alterações na força de contração cardíaca, portanto, podem ser observadas pela variação na quantidade de cálcio disponível no meio extracelular [KIM et al., 2000].

Segundo Eisner et al. [1998], uma intervenção que aumente a concentração de cálcio intracelular pode aumentar a força de contração em miócitos cardíacos, mas não há como definir se este efeito é devido apenas ao aumento do cálcio intracelular isoladamente ou por um aumento na fração liberada pelo RS [VORNANEN et al., 2002].

A importância do cálcio extracelular para contração cardíaca foi evidenciada pela adição de concentrações crescentes de cálcio no meio extracelular, chegando a um aumento de 90% da força de contração cardíaca em relação aos valores iniciais (efeito inotrópico positivo). Tal resultado sugere uma elevada dependência do cálcio

extracelular para a contração cardíaca, embora um aumento da liberação de cálcio Ca^{2+}-induzida pelo RS não possa ser descartada [EISNER et al., 1998].

A maioria dos autores, que concentraram seus estudos na análise da relação do fosfato inorgânico com o cálcio, descreveram a grande dificuldade de realizar seus experimentos em células intactas (*in vivo*), pois pequenas alterações nas concentrações de Pi podem provocar outras mudanças metabólicas não necessariamente relacionadas ao mecanismo de contração muscular [COOKE et al., 1985; MILLAR et al., 1990; WESTERBLAD et al., 2002; BOSE et al., 2003; HE et al., 2003; DEBOLD et al., 2004; HINKEN et al., 2004; DUTKA et al., 2005].

Dessa maneira, pelo fato da ação do fosfato inorgânico estar sobre influência do metabolismo muscular, muitos autores optaram por realizar os experimentos *in vitro* [DUKE et al., 2001; FUKUDA et al., 2001; VAN DER VELDEN et al., 2001; DEBOLD et al., 2002; HINKEN et al., 2004].

Um estudo com o objetivo de analisar o efeito do Pi citoplasmático em fibras musculares (*in vitro*) utilizando uma microinjeção de Pi em fibras não fatigadas (aumento de 2–21 mM) observou que a concentração de Ca^{2+} intracelular em repouso e durante estimulação tetânica foi reduzida após as injeções de Pi [DUTKA et al., 2005]. Porém, o autor não afirma se a diminuição do cálcio intracelular ocorreu durante ou depois de injeção de Pi, pois as alterações poderiam estar relacionadas com a utilização do Ca^{2+} necessário para alteração conformacional da subunidade TnC da troponina ou pela retomada de cálcio pelo RS após a contração muscular [COOKE et al., 1985; MILLAR et al., 1990].

Em outra pesquisa, realizado por Dahlstedt et al. [2000], utilizou-se ratos modificados geneticamente com a ausência da creatina quinase (CK) nas fibras musculares e, consequentemente, diminuindo a liberação do fosfato inorgânico pela catálise da fosfocreatina. O resultado mostrou que nos ratos com ausência da creatinina quinase as concentrações de Pi e do Ca^{2+} intracelular permaneceram quase constantes e, consequentemente, não foi observada uma diminuição significativa da força muscular em contrações tetânicas. Este resultado não foi similar com os ratos sem a modificação genética, onde observou-se uma concentração do Pi, uma diminuição do Ca^{2+} intracelular e da força muscular. A conclusão do estudo é a confirmação de que o aumento citoplasmático do Pi influencia diretamente na concentração de Ca^{2+} em

contrações tetânicas. Entretanto, o autor questiona se a inibição é devido à liberação do Ca^{2+} pelos receptores de rianodina (RyR) ou devido à precipitação do fosfato de cálcio (CaPi) dentro do retículo sarcoplasmático.

Dahlstedt et al. [2001] realizou um estudo similar confirmando os resultados encontrados em sua pesquisa anterior [DAHLSTEDT et al., 2000], onde analisou a concentração de Pi em fibras musculares com inibição farmacológica da atividade enzimática da creatina quinase (CK). Neste experimento, os ratos com a inibição farmacológica da enzima CK permaneceram com a concentração de Pi e de Ca^{2+} intracelular constante e os ratos sem a inibição tiveram um aumento da concentração do Pi e uma diminuição do Ca^{2+} intracelular nas contratações tetânicas eletricamente estimuladas.

Existem considerações de que o Pi não influencia apenas na diminuição da concentração sérica do cálcio através de sua atratividade para a formação do fosfato de cálcio e conseqüente diminuição da quantidade disponível de Ca^{2+}, mas que também atua sobre as enzimas (ATPase) dos receptores de rianodina do retículo sarcoplasmático. Stienen et al. [2000], analisou a influência do Pi e da alteração do pH, sobre a atividade da ATPase que atua na liberação do Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e concluiu que a atividade da ATPase é mais sensível ao aumento de Pi (de 0 a 30 mM) do que à diminuição do pH (de 7,1 para 6,2). Entretanto, os autores observaram que durante o processo inverso (captação dos Ca^{2+} para o RS) o efeito combinado do Pi e do pH é mais pronunciado do que a ação independente do Pi e do pH.

Balog et al. [2000] e Duke et al. [2000] reforçam os achados encontrados Stienen et al. [2000], confirmando a potencial ação do Pi como regulador endógeno do canal de rianodina (RyR), responsável pela liberação do Ca^{2+} pelo RS dos músculos esqueléticos.

De acordo com Bruton et al. [1998], são poucas as informações disponíveis em relação ao aumento do Pi ser ou não dependente de temperatura, pois a maioria dos estudos utilizados em fibras musculares isoladas (*in vitro*) foram realizadas em baixas temperaturas. Coupland et al. [2001] analisou o efeito da adição do Pi em diversas temperaturas entre 5°C e 30°C, em contrações máximas do músculo psoas de coelhos e concluíram que a influência do Pi é menor em temperaturas fisiológicas (menor que 20% com 25 mM Pi). Este achado é similar ao encontrado por Debold et al. [2004], que

observaram o efeito da elevação do nível de Pi sobre a contração de fibras do tipo I (lentas) e fibras do tipo II (rápidas) em diferentes temperaturas. Os resultados demonstraram que a força isométrica máxima foi significativamente reduzida em temperaturas de 15°C em relação àquelas observadas a 30 °C, tanto em fibras do tipo I quanto em fibras do tipo II. Entretanto, a velocidade de encurtamento não foi significativamente afetada pela elevação do Pi em ambas as temperaturas.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do fosfato inorgânico (Pi) na precipitação do cálcio sérico, assim como validar um protocolo experimental para determinar a dose ideal para que esta relação tenha o máximo resultado esperado.

O aumento da concentração sérica de fosfato inorgânico, necessário para precipitar com o cálcio sérico, foi conseguido através da indução de fosfato de potássio em animais vivos via injeção intraperitoneal. Apesar de não terem sido realizadas experiências *in vitro*, observamos que os resultados encontrados nesta pesquisa ocorreram de maneira semelhante aos relatados por alguns estudos. Corroborando com este pressuposto, existem constatações de que o Pi influencia no mecanismo de ação das pontes-cruzadas, devido à diminuição da quantidade de Ca^{2+} liberado pelo retículo sarcoplasmático [FRUENS et al., 1994; BALOG et al., 2000; DUKE et al., 2000; ALLEN et al., 2001; WESTERBLAD et al., 2002; WESTERBLAD et al., 2002; BOSE et al., 2003; HE et al., 2003; DEBOLD et al., 2004; HINKEN et al., 2004]. Estes autores realizaram suas pesquisas utilizando o aumento da concentração sérica do fosfato inorgânico *in vitro*.

Neste trabalho, conforme citado no capítulo 2, a análise bioquímica da uréia e da creatinina sérica teve como objetivo verificar a integridade metabólica, pois as alterações nesses parâmetros são indicadores diretos do funcionamento normal do sistema urinário e do metabolismo protéico que poderiam influenciar diretamente nos resultados desse trabalho. O aumento na concentração de uréia e da creatinina no plasma é indicador de uma variedade de doenças renais, com diferentes lesões glomerular, tubular ou vascular [GRANOUILET et al., 1996].

Ao se analisar os resultados da uréia na Tabela 6.4, observam-se que de todos os modelos analisados, nenhum se ajusta significativamente aos dados e este resultado está

diretamente relacionado com a lógica biológica, pois sabe-se que a concentração de uréia sérica pode ser devido a disfunções renais [LUM et al., 1989] ou produto da degradação de proteínas exógenas oriundas da alimentação, podendo ocorrer um aumento da concentração de uréia decorrente do processo alimentar [LASKOW et al., 1990; CORREIA et al., 2005; NAGAYA et al., 2006]. No entanto, este não é o caso neste trabalho, visto que todos os animais encontravam-se em jejum antes da realização dos experimentos.

No caso da creatinina, observou-se situação semelhante ao da uréia, onde verificou-se uma correlação negativa entre o efeito da injeção de Pi sobre a concentração de creatinina sérica.

Na Tabela 6.7, observa-se que, de todos os modelos analisados, nenhum se ajusta significativamente aos dados. Este resultado também está diretamente relacionado com a lógica biológica, pois existem duas possibilidades de ocorrer um aumento sérico da creatinina: disfunções renais ou um aumento da atividade muscular esquelética [GREENBERG et al, 1999; GRANOUILET et al, 1996].

Os resultados apresentados neste experimento demonstraram ausência de variações nas concentrações de creatinina e uréia nos animais analisados bioquimicamente. Esta afirmação pode ser confirmada pelos resultados encontrados por Mendelssohn et al., [1999], Usher-Smith [2006] e Lin et al. [2007], onde verificaram que níveis elevados de creatinina sérica são freqüentemente encontrados em pacientes com hipertensão, arteriosclerose, diabete melitos, anemia, com insuficiência renal ou nefrotoxidade [KAIRA, 1998; EDMUNDS et al., 2000]

Zhu et al. [2002] e Kopp et al. [2004] descrevem que o aumento da concentração de creatinina sérica pode indicar possíveis lesões do músculo esquelético, ocasionado por hipoxia, calor ou convulsões.

Ao analisar os resultados da creatinina e da uréia em conjunto observou-se que estes estão de acordo com os resultados encontrados por outros autores, pois se ocorresse alguma alteração na concentração de creatinina seria esperado um aumento também da uréia. Verificando as vias metabólicas de síntese endógena da creatinina, podemos observar que a arginina, um dos aminoácidos precursores desta síntese, também serve como precursor para a produção da uréia. O aumento da creatinina poderia fornecer uma fonte adicional de arginina e incrementar a produção de uréia e

consequentemente ocorreria um aumento proporcional de creatinina e uréia [DESHMUKH et al, 1991].

Dessa maneira, a manutenção da concentração sérica da uréia e da creatinina demonstra que os animais analisados bioquimicamente estavam sadios antes da aplicação da injeção de fosfato de potássio, fato observado pelos resultados das amostras sanguíneas do grupo controle e, que permaneceram sem alterações nos parâmetros analisados mesmo depois da aplicação do fosfato inorgânico, comprovados pelas análises sanguíneas dos grupos contendo variações das doses de fosfato de potássio.

Um dos resultados mais importantes deste trabalho é que a quantidade de cálcio sérico foi substancialmente reduzida depois da injeção de Pi (Figura 6.4). Percebe-se também que esta redução variou de acordo com a dose utilizada, sendo que, após 5,0 mg/kg não foi observada nenhum aumento estatisticamente significante (Tabela 6.14). Desta forma, pode-se pressupor que esta resposta tenha alcançado um certo equilíbrio metabólico, visto que doses maiores de Pi não levam a maiores alterações na concentração de cálcio.

Observamos ainda que, de todos os modelos analisados, o modelo sigmoidal de quatro parâmetros é o que melhor explica a variação de uma variável em função da outra, pois além de ter um alto coeficiente de determinação (R^2) e se ajustar significativamente aos dados ao nível de 5% ($p \leq 0,05$), é o que melhor expressa a lógica biológica, pois permite verificar que existe uma correlação positiva entre o aumento da concentração sérica do fosfato inorgânico e a diminuição da concentração sérica do cálcio.

É importante observar que, tanto na Figura 6.3 e 6.4, que destacam as variações nas contrações séricas do fosfato inorgânico e do cálcio sérico (respectivamente) sobre a influência de doses diferentes de fosfato de potássio, em certo momento da curva sigmoidal de quatro parâmetros é possível observar uma estabilização da resposta apresentada, onde não mais encontramos diferenças estaticamente significantes entre as doses posteriores (2,5 mg/kg para o fosfato inorgânico sérico e 5,0 mg/dl para o cálcio sérico). Possivelmente, esta estabilização é decorrente da capacidade endógena de metabolizar/excretar substâncias em altas concentrações. Esta observação está de acordo com as pesquisas prévias, como a realizada por Hinken et al. [2004] que analisaram a

ação do Pi através de uma solução com quantidades variadas de Pi (0,5; 2,5; 5,0 e 10mM) em fibras cardíacas de ratos (*in vitro*) e observaram uma redução significativa da força muscular e da quantidade de Ca^{2+} com a adição de 2,5, 5,0 e 10mM. O pesquisador não observou nenhuma alteração significativa com a adição de 0,5mM de Pi e após 5,0mM ocorreu uma estabilização da diminuição da força isométrica (> 10%) devido a um equilíbrio metabólico.

Resultado semelhante, relacionando o aumento do Pi e a conseqüente redução do Ca^{2+} liberado pelo retículo sarcoplasmático, foi encontrado por Dutka et al. [2005], que observaram um aumento de ≥ 30 mM de Pi em fibras musculares de ratos submetidos a um esforço físico exaustivo e uma conseqüente diminuição da quantidade de Ca^{2+} liberado pelo retículo sarcoplasmático, ocorrendo uma diminuição de 20% da força muscular durante os 20 minutos iniciais da atividade.

Duke et al. [2001a] observaram que a quantidade de Ca^{2+} liberado pelo RS em resposta a despolarização do túbulo-T, estimulado por cafeína, foi reduzida pelo aumento na concentração de Pi.

No mesmo ano, Duke et al. [2001b], analisando fibras isolados do extensor longo dos dedos de ratos Wistar (*in vitro*), observaram um aumento da precipitação e formação do fosfato de cálcio (Ca-Pi) dentro do RS em quantidades ≥ 5 mM de Pi. A precipitação foi aumentada em solução de Pi e fosfocreatina.

Deve-se considerar que a principal contribuição desta pesquisa é a realização do experimento *in vivo*, além de validar um protocolo experimental apresentando uma droga (fosfato de potássio) que permite atingir o objetivo proposto, que é o aumento da concentração sérica do fosfato inorgânico, sem causar nenhum tipo de lesão ao animal, resultado verificado através da análise bioquímica da concentração sérica da creatinina e da uréia.

Neste trabalho, a utilização de um experimento *in vivo*, comparando com os resultados apresentados utilizando modelos *in vitro*, mostrou-se suficiente para representar as alterações nos parâmetros bioquímicos do fosfato inorgânico e cálcio analisados. Além disso, foi possível realizar a parte experimental com baixo custo na aquisição das drogas e dos reagentes. Esta facilidade permite a reprodutibilidade do experimento sem a necessidade de muitos equipamentos, baixa duração e confiabilidade no resultado, cuja resposta satisfaz as necessidades deste trabalho.

7.1 Conclusão

Neste capítulo, discutimos os resultados das análises estatísticas e apresentamos pesquisas anteriores que diferem ou corroboraram com este trabalho.

No próximo capítulo, concluiremos a partir dos dados obtidos nos ensaios experimentais, além de propor futuros projetos que possam corroborar, aprimorar ou se beneficiar destes resultados.

Capítulo 8

Conclusão e Trabalhos Futuros

8.1 Conclusões Gerais

Neste trabalho, realizamos diversos experimentos com o objetivo de verificar se o fosfato inorgânico, induzido através da injeção de fosfato de potássio em animais vivos, causa precipitação com o cálcio sérico e, qual quantidade ideal a ser injetada para que tal precipitação ocorra efetivamente.

Para tal, foi necessário, inicialmente, definir a substância a ser analisada bioquimicamente. Através de revisão bibliográfica, observamos uma quantidade significativa de artigos descrevendo que a concentração do fosfato inorgânico, oriunda da hidrólise da fosfocreatina ou da ATP, seria responsável pela diminuição da qualidade da contração muscular. Esta interferência no processo contrátil ocorre através da precipitação com o cálcio oriundo do retículo sarcoplasmático.

Para proporcionar o aumento artificial na concentração de fosfato inorgânico, foi necessária ainda a definição de uma substância que, quando inoculada no organismo de um animal, não causasse qualquer tipo de lesão orgânica. Ou ainda, para que pudéssemos ter o resultado esperado, a substância a ser utilizada deveria ter sido testada e aprovada previamente. Através de uma revisão bibliográfica, observamos qual substância era amplamente utilizada no controle da hipofosfatemia e concluímos que o fosfato de potássio era a opção mais apropriada.

Para a definição do protocolo experimental, foram realizados vários testes onde observamos que a substância utilizada (fosfato de potássio) mostrou-se capaz de aumentar a concentração do fosfato inorgânico sérico adequadamente, ou seja, com o aumento dos parâmetros bioquímicos do Pi, foi possível associar uma determinada atividade de precipitação com a diminuição do cálcio sérico observado nas análises sanguíneas.

A proposta de uma metodologia para a realização dos experimentos em animais vivos é um ponto de destaque deste trabalho. O que se observa na literatura em geral, conforme apresentada nos capítulos anteriores, é que os trabalhos não apresentam uma proposta de metodologia *in vivo*, sendo que alguns experimentos são impossíveis de serem repetidos ou comparados devido à quantidade de equipamentos, instrumentação e substância utilizados para a realização *in vitro*. A metodologia apresentada no Capítulo 5 é uma proposta que pode ser utilizada para garantir a repetibilidade de experimentos.

As principais contribuições observadas na escolha do método são:

- facilidade na execução e a reprodução do experimento.

- o modelo apresentado mostrou-se suficiente para representar as alterações nos parâmetros bioquímicos do fosfato inorgânico e cálcio analisados (*in vivo*);

- o modelo experimental foi eficiente com relação à velocidade e à facilidade de realização, permitindo que outras pesquisas, como por exemplo, para análise da qualidade da contração muscular, possam ser realizadas sem a necessidade de sacrificar o animal;

- Independência com relação às alterações na amplitude de outros parâmetros séricos, como é o caso da creatinina e da uréia, permitindo avaliar a integridade orgânica do animal.

Um dos grandes problemas encontrados no modelo *in vivo* é a impossibilidade de controlar o metabolismo, as patologias associadas, ritmo circadiano ou alterações comportamentais dos animais utilizados no experimento. Uma conseqüência imediata poderia ser um elevado grau de resultados alterados ou mascarados dos parâmetros analisados, tornando-se bastante remota a possibilidade de uma boa interpretação dos resultados bioquímicos. Foi justamente por isso, que adotou-se a restrição alimentar antes do experimento, a ambientação no laboratório durante um período de, pelo menos, 1 h antes do experimento e com a finalidade de minimizar as variações circadianas, todos os experimentos foram conduzidos sempre entre 13:00 e 17:00 h. Tais procedimentos, mesmo não excluindo totalmente as variáveis que poderiam interferir no resultado, diminuiu a influência de processos fisiológicos que poderiam interferir nos parâmetros analisados, garantindo assim uma melhor representação das análises bioquímicos.

De forma geral, podemos destacar as seguintes conclusões emanadas deste trabalho:

- o fosfato de potássio é uma substância capaz de causar precipitação de cálcio sérico sem qualquer lesão nos animais;

- a quantidade ideal de fosfato de potássio a ser injetada para aumento da concentração de fosfato inorgânico e diminuição do cálcio sérico é de 5,0 mg/kg, sendo que doses superiores ou inferiores não apresentam efeitos na concentração de cálcio sérico devido a sua precipitação com o fosfato inorgânico. Este resultado é decorrente de um equilíbrio metabólico, pois o organismo tende a manter a homeostasia e doses superiores tendem a ser expelidas pelas vias excretoras;

- a metodologia apresentada é útil como modelo experimental para avaliar a influência do fosfato inorgânico sobre a concentração do cálcio na contração muscular *in vivo*, podendo abrir um leque para outros projetos com objetivos similares ou baseados nos resultados obtidos neste trabalho.

Destaca-se que este trabalho não teve como objetivo explorar em detalhes os possíveis mecanismos fisiológicos associados que podem interferir e/ou influenciar nos resultados encontrados. Neste sentido, outros trabalhos devem ser ainda executados no sentido de elucidar aquelas questões.

8.2 Estudos Futuros

Neste trabalho, as alterações dos parâmetros bioquímicos do fosfato inorgânico e do cálcio sérico foram tratadas como processos praticamente estacionários, visto que os animais utilizados nos experimentos não foram submetidos a nenhum tipo de esforço físico, pois a proposta inicial não tinha este objetivo. Entretanto, em estudos futuros, podem ser realizadas análises bioquímicas colocando os animais em situações de esforço físico como, por exemplo, em uma esteira rolante, em atividades aquáticas ou outras formas de atividades físicas com intensidades variadas. Com estas variáveis de esforço físico, poderíamos verificar a influência do fosfato inorgânico no mecanismo contrátil em diferentes atividades, velocidade e intensidade de contração muscular. Também poderiam ser analisadas bioquimicamente outras substâncias séricas que poderiam, ou não, ser influenciadas pelo aumento na concentração do fosfato inorgânico e se estas substâncias poderiam afetar a qualidade do mecanismo de contração ou integridade orgânica do animal.

Uma variação do estudo seria analisar a influência do aumento da concentração do fosfato inorgânico em fibras musculares distintas, como o músculo cardíaco e o esquelético, comparando os resultados em repouso e diferentes atividades físicas. O objetivo desta proposta é verificar a influência do Pi em diferentes fibras musculares, visto que os artigos [BAILEY et al., 1990; SHIELS et al., 1997; FRANK et al., 2003] destacam que as fibras musculares cardíacas são mais sensíveis ao aumento de concentração do Pi. Mesmo que os resultados destes artigos indiquem esta predisposição das fibras cardíacas, não se descarta possibilidade de utilização desta

metodologia, pois todas as pesquisas foram realizadas *in vitro*, não possibilitando a análise da alteração do Pi com animais realizando atividades físicas.

Outro trabalho importante seria estudar as possíveis alterações nos parâmetros da avaliação eletromiográfica decorrentes da injeção de diferentes quantidades de fosfato de potássio. O objetivo deste trabalho seria traçar um paralelo entre as alterações observadas na contração muscular, pela injeção de fosfato de potássio, conforme estabelecido neste trabalho, e as variações nos parâmetros de análise EMG (como por exemplo, freqüência mediana, alterações no espectro EMG e outras).

Tais estudos, poderiam ser comparados com os realizados nesse trabalho e/ou utilizar a metodologia e os resultados encontrados como início de um novo projeto experimental, como é o caso da quantidade ideal de fosfato de potássio (5,0 mg/kg) para conseguir uma diminuição significativa de cálcio sérico.

Estudos futuros analisando as alterações circadianas, como a alteração de temperatura, poderiam ser realizadas com a injeção de fosfato de potássio em animais vivos. Estes experimentos teriam como finalidade verificar possíveis alterações nos parâmetros devido aos ciclos circadianos. É importante salientar, que outros experimentos já foram realizados associando o aumento da concentração de Pi com a alteração de temperatura [BRUTON et al., 1998; COUPLAND et al., 2001; DEBOLD et al., 2004]. Entretanto, são poucas as informações disponíveis em relação ao aumento do Pi ser ou não dependente de temperatura, pois a maioria dos estudos utilizados em fibras musculares isoladas (*in vitro*) foram realizadas em baixas temperaturas e nenhum *in vivo*. Dessa maneira, não se descarta ainda a possibilidade de utilização desta metodologia.

Referências Bibliográficas

[1] ALLEN, D. G.; LANNERGREN, J.; WESTERBLAD, H. Muscle cell function during prolonged activity: cellular mechanisms of fatigue. *Journal Experimental Physiology*, v. 80, pp. 497–527, 1995.

[2] ALLEN, D. G.; WESTERBLAD, H. Role of phosphate and calcium stores in muscle fatigue. *Journal of Physiology*, v. 536, pp. 657-665, 2001.

[3] ALLEN, D.; WESTERBLAD, H. Lactic Acid-The Latest Performance Enhancing Drug. *Science*, v. 20, pp. 1112-1113, 2004.

[4] ARMBRECHT, H. J.; BOLTZ, M. A.; RITTER, C. S.; BROWNC, A. J. Parathyroid hormone stimulation of the renal 25-hydroxyvitamin D-1α-hydroxylase - Effect of age and free radicals. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 103, pp. 330–333, 2007.

[5] BAILEY, J. R.; DRIEDZIC, W. R. Enhanced maximum frequency and force development of fish following temperature acclimation. *Journal Exp. Biology*, v. 149, pp. 239-254, 1990.

[6] BALOG, E. M.; GALLANT, E. M. Modulation of the sarcolemmal L-type current by alteration in SR Ca^{2+} release. *American Journal of Physiological*, v. 276, pp. 128-135, 1999.

[7] BALOG, E. M.; FRUEN, B. R.; KANE, P. K.; LOUIS, C. F. Mechanisms of Pi regulation of the skeletal muscle SR Ca^{2+} release channel. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 278, pp. C601 - C611, 2000.

[8] BALOG, E. M.; FITTS, R. H. Effects of depolarization and low intracellular pH on charge movement currents of frog skeletal muscle fibers. *Journal of Physiology*, v. 90, pp. 228 - 234, 2001.

[9] BANGSBO, J.; KRUSTRUP, P.; GONZÁLEZ-ALONSO, J.; SALTIN, B. ATP production and efficiency of human skeletal muscle during intense exercise: effect of previous exercise. *American Journal Physiology - Endocrinology Metabolism*, v. 280, pp. E956 – E964, 2001.

[10] BARTHEL, T. K.; MATHERN, D. R.; WHITFIELD, G. K.; HAUSSLER, C. A.; HOPPER, H. A.; HSIEH, J.; SLATER, S. A.; HSIEH, G.; KACZMARSKA, M.; JURUTKA, P. W.; KOLEK, O. I. 1,25-Dihydroxyvitamin D_3/VDR-mediated induction of FGF23 as well as transcriptional control of other bone anabolic and catabolic genes that orchestrate the regulation of phosphate and calcium mineral metabolism. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 103, pp. 381–388, 2007.

[11] BEAUGE, L. Breakdown of Na/K-exchanging ATPase phosphoenzymes formed from ATP and from inorganic phosphate during Na-ATPase activity Response to Na and K ions. *European Journal of Biochemistry*, v. 268, pp. 5627–5632, 2001.

[12] BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, v. 415, pp. 198-204, 2002.

[13] BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. *Bioquímica*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

[14] BERRIDGE, M. J.; LIPP, L.; BOOTMAN, M. D. The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nature: Molecular Cell Biology*, v. 1, pp. 11-21, 2000.

[15] BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, L. Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nature: Molecular Cell Biology*, v. 4, pp. 517-529, 2003.

[16] BIOCLIN. *Cálcio – instruções de uso*. Disponível em: http://www. Bioclin.com.br/isuo/cálcio.pdf. Acesso em: 19 de julho de 2006a.

[17] BIOCLIN. *Fósforo – instruções de uso*. Disponível em: http://www. Bioclin.com.br/isuo/cálcio.pdf. Acesso em: 19 de julho de 2006b.

[18] BLOUIN, A.; MOLEZ, S.; PHAM, D; AYACH, B.; DUSSAULT, P.; ESCHER, E.; JENG, A.; BATTISTINI, B. A Novel Procedure for daily measurements of

hemodynamical, hematological, and biochemical parameters in conscious unrestrained rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. v. 44, pp. 489–505, 2000.

[19] BOSE, S.; FRENCH, S.; EVANS, F. J., JOUBERT, F.; BALABAN, R. Metabolic Network Control of Oxidative Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. v. 278, nº. 40, pp. 39155–39165, 2003.

[20] BROOKS, G. A. Lactate doesn't necessarily cause fatigue: why are we surprised?. *Journal of Physiology,* v. 536, nº 1, p. 01, 2001.

[21] BRUTON, J. D.; LÄNNERGREN, J.; WESTERBLAD, H. Effects of CO_2 induced acidification on the fatigue resistance of single mouse muscle fibers at 28°C. *Journal of Applied Physiology,* v. 85, pp. 478-483, 1998.

[22] CAMPBELL, I. Thyroid and parathyroid hormones and calcium homeostasis. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. v. 6, pp. 333-336, 2005.

[23] CAMPBELL-O'SULLIVAN, S. P.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; PEIRCE, N.; GREENHAFF, P. L. Low intensity exercise in humans accelerates mitochondrial ATP production and pulmonary oxygen kinetics during subsequent more intense exercise. *Journal of Physiology*, v. 538, pp. 931-939, 2002.

[24] CANÇADO, J. R.; LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GREGO, J. B.; GALIZI, J. *Métodos de Laboratórios Aplicados a Clínica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

[25] CATHY, J. D. V. M. *Exotic Companion Medicine Handbook for Veterinarians*. Wingers Publishing, Inc, 1996.

[26] CHIESI, M.; HO, M. M.; INESI, G.; SOMLYO, A. V.; SOMLYOTRIE, A. P. Primary Role of Sarcoplasmic Reticulum in Phasic Contractile Activation of Cardiac Myocytes with Shunted Myolemma. *Journal of Cell Biology*, v. 91, pp. 728–724, 1981.

[27] COOKE, R.; PATE, E. The effects of ADP and phosphate on the contraction of muscle fibers. *Journal of Biophysical*, v. 48, pp. 789-798, 1985.

[28] CORREIA, D. P. A.; MAGALHÃES, J. M. C. S.; MACHADO, A. A. S. C. Array of potentiometric sensors for simultaneous analysis of urea and potassium. *Talanta*, v. 67, pp. 773–782, 2005.

[29] COUPLAND, M; PUCHERT, E.; RANATUNGA, K. W. Temperature dependence of active tension in mammalian (rabbit psoas) muscle fibres: effect of inorganic phosphate. *Journal of Physiology*, v. 536, nº 3, pp. 879–891, 2001.

[30] DAHLSTEDT, A. J.; KATZ, A.; WIERINGA, B.; WESTERBLAD, H. Is creatine kinase responsible for fatigue? Studies of isolated skeletal muscle deficient in creatine kinase. *FASEB Journal*, v. 14, pp. 982–990, 2000.

[31] DAHLSTEDT, A. J.; KATZ, A.; WESTERBLAD, H. Role of myoplasmic phosphate in contractile function of skeletal muscle: studies on creatine kinase-deficient mice. *Journal of Physiology,* v. 533, pp. 379–388, 2001.

[32] DE GROOT, L. C. P.; VAN ES, A. J. H.; VAN RAAIJ, J. M. A.; VOGT, J. E.; HAUTVAST, J. G. A. J. Adaptation of energy metabolism of overweight women to alternating and continuous low energy intake. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 50, pp. 1314-1323, 1989.

[33] DEBOLD, E. P.; DAVE, H.; FITTS, R. H. Fiber type and temperature dependence of inorganic phosphate: implications for fatigue. *American Journal of Physiology - Cell Physiology,* v. 287, pp. C673–C681, 2004.

[34] DUKE, A.; STEELE, D. Characteristics of phosphate-induced Ca^{2+} efflux from the SR in mechanically skinned rat skeletal muscle fibers. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 278, pp. C126 - C135, 2000.

[35] DUKE, A.; STEELE, D. Interdependent effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} regulation in mechanically skinned rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*, v. 531, nº 3, pp. 729–742, 2001a.

[36] DUKE, A.; STEELE, D. Mechanisms of reduced SR Ca^{2+} release induced by inorganic phosphate in rat skeletal muscle fibers. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 281, pp. C418–C429, 2001b.

[37] DUTKA, T. L.; COLE, L.; LAMB, G. D. Calcium phosphate precipitation in the sarcoplasmic reticulum reduces action potential-mediated Ca^{2+} release in mammalian skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 289, pp. C1502-C1512, 2005.

[38] EGELMAN, E. H. Actin allostery again?. *Nature Structural Biology*, v. 8, nº 9, pp. 735-736, 2001.

[39] EISNER, D. A. The control of Ca release from the cardiac sarcoplasmic reticulum: regulation versus autoregulation. *Cardiovascular Res.*, v. 38, pp. 589-604, 1998.

[40] ESSE´N-GUSTAVSSON, C.; BLOMSTRAND, B. Effect of exercise on concentrations of free amino acids in pools of type I and type II fibres in human

muscle with reduced glycogen stores. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 174, pp. 275-281, 2002.

[41] FAVERO, T. G. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release and muscle fatigue. *Journal Applied Physiology*, v. 34, pp. 471-483, 1999.

[42] FORSDYKE, D. R. The Origin of Species Revisited: a Victorian who Anticipated Modern Developments in Darwin's Theory. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 95, pp. 628-629, 2002.

[43] FOSS, M. L.; KETEYIAN, S. J. *Fox – Bases Fisiológicas do Exercício e do Esporte*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

[44] FRANK, F. K.; BOLCK, B.; ERDMANN, E.; SCHWINGER, R. G. H. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovascular Research*, v. 57, pp. 20-27, 2003.

[45] FRASER, J.; MIDDLEBROOK, C. E.; USHER-SMITH, J. A.; SCHWIENING, C. J.; HUANG, C. L. The effect of intracellular acidification on the relationship between cell volume and membrane potential in amphibian skeletal muscle. *Journal of Physiology*, v. 563, nº 3, pp. 745-764, 2005.

[46] FRIEDRICH, O.; EHMER, T.; UTTENWEILER, D.; VOGEL, M.; BARRY, P. H.; FINK, R. H. A. Numerical Analysis of Ca^{2+} Depletion in the Transverse Tubular System of Mammalian Muscle. *Biophysical Journal,* v. 80, pp. 2046-2055, 2001.

[47] FRUENS, B. R; MICKELSON, J. R.; SHOMER, N. H.; ROGHAIR, T. J.; LOUIS, C. F. Regulation of the Sarcoplasmic Reticulum Ryanodine Receptor by Inorganic Phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, pp. 192-196, 1994.

[48] FRYER, M. W.; OWEN, V. J.; LAMB, G. D.; STEPHENSON, D. G. Effects of creatine phosphate and Pi on Ca^{2+} movements and tension development in rat skinned skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*, v. 482, pp. 123-140, 1995.

[49] FRYER, M. W.; STEPHENSON, D. G. Total and sarcoplasmic reticulum calcium contents of skinned fibres from rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*, v. 493, pp. 357-370, 1996.

[50] FUCHS, F.; SMITH, S. H. Calcium, Cross-Bridges, and the Frank-Starling Relationship. *News Physiology Science*, v. 16, pp. 5–10, 2001.

[51] FUKUDA, N.; O-UCHI, J.; SASAKI, D.; KAJIWARA, H.; ISHIWATA, H.; KURIHARA, S. Acidosis or inorganic phosphate enhances the length dependence of

tension in rat skinned cardiac muscle. *Journal of Physiology*, v. 536, nº 1, pp. 153–160, 2001.

[52] GAASBEEK, A.; MEINDERS, E. Hypophosphatemia: An update on its etiology and treatment. *The American Journal of Medicine*, v. 118, pp. 1094–1101, 2005.

[53] GALPERIN, M. Y.; WALKER, D. R.; KOONIN, E. V. Analogous Enzymes: Independent Inventions in Enzyme Evolution. *Genome Research*, v. 8, pp. 779–790, 1998.

[54] GEGENHEIMER, P. Enzyme nomenclature: functional or structural? *RNA*, v. 6, pp. 1695-1697, 2000.

[55] GLADDEN, L.B. Lactate acid: new roles in a new millennium. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, nº 2, pp. 395-397, 2001.

[56] GLADDEN, L.B. Lactate Metabolism: a new paradigm for the third millennium. *Journal of Physiology*, v. 558, pp. 5-30, 2004.

[57] GOLDSPINK, G. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. *Biochemical Physiology*, v. 120, pp. 5-15, 1998.

[58] GRANOUILET, R.; RASCLE, F.; SIEALLAC, P.; RABY, N.; FREY, J. Urinary Sodium, Potassium, Calcium, Urea, and Creatinine Determination by Ektachem 250. *Clinical Chemistry*, v. 42, nº 1, pp. 105-106, 1996.

[59] GUIMARÃES, E.C. *Geoestatística básica e aplicada*. Universidade Federal de Uberlândia. p. 15, 2004.

[60] HALHALI, A.; DÍAZ, L.; AVILA, E.; ARIZA, A. C.; GARABÉDIAN, M.; LARREA, F. Decreased fractional urinary calcium excretion and serum 1,25-dihydroxyvitamin D and IGF-I levels in preeclampsia. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 103, pp. 803–806, 2007.

[61] HALL, B. G. Predicting Evolution by In Vitro Evolution Requires Determining Evolutionary Pathways. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, nº 9, pp. 3035-3038, 2002.

[62] HE, Z.; CHILLINGWORTH, R. K.; BRUNE, M.; CORRIE, J. E. T.; WEBB, M. R.; FERENCZI, M. A. The efficiency of contraction in rabbit skeletal muscle fibres, determined from the rate of release of inorganic phosphate. *Journal of Physiology*, v. 517, nº 3, pp. 839-854, 2003.

[63] HENRY, J. B. *Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais*. 19ª ed. São Paulo: Editora Manole, 1999.

[64] HINKEN, A. C.; MCDONALD, K. S. Inorganic phosphate speeds loaded shortening in rat skinned cardiac myocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology,* v. 287, pp. C500–C507, 2004.

[65] HOCHACHKA, P. W. The metabolic implications of intracellular circulation. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, nº 22, pp. 12233-12239, 1999.

[66] HOGREL, J. Use of surface EMG for studying motor unit recruitment during isometric linear force ramp. *Journal of Electromyography and Kinesiology*, v. 13, pp. 417-423, 2003.

[67] HOFFMANN, R.; VIEIRA, S. *Análise de regressão: uma introdução à econometria*. 3ª ed. São Paulo: Editora Hucitec, 1998.

[68] HOSTLER, D.; SCHWIRIAN, C. I.; CAMPOS, G.; TOMA, K.; CRILL, M. T.; HAGERMAN, G. R.; HAGERMAN, F. C.; STARON, R. S. Skeletal muscle adaptations in elastic resistance-trained young men and women. *European Journal of Applied Physiology*, v. 86, nº 2, pp. 112-118, 2001.

[69] IKEGAME, M.; EJIRI, S.; OZAWA, H. Calcitonin-induced change in serum calcium levels and its relationship to osteoclast morphology and number of calcitonin receptors. *Bone*, v. 35, pp. 27-33, 2004.

[70] IRVING, M.; PIAZZESI, G.; LUCII, L.; SUN, Y.; HARFORD, J. J.; DOBBIE, I. M.; FERENCZI, M. A.; RECONDITI, M.; LOMBARDI, V. Conformation of the myosin motor during force generation in skeletal muscle. *Nature Structural Biology*, v. 7, nº 6, pp. 482-485, 2000.

[71] ITOI, E.; MINAGAWA, H.; SATO, T.; SATO, K.; TABATA, S. Isokinetic Strength After Tears of the Supraspinatus Tendon. *Journal Bone Joint Surgery*, v. 79-B, pp. 77-82, 1997.

[72] JENESON, J. A. L.; WESTERHOFF, H. V.; KUSHMERICK, M. J. A metabolic control analysis of kinetic controls in ATP free energy metabolism in contracting skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, v. 279, pp. C813–C832, 2000.

[73] JERMIIN, L. S.; POLADIAN, L.; CHARLESTON, M. A. Is the "Big Bang" in Animal Evolution Real?. *Science*, v. 310, pp. 1910–1911, 2005.

[74] JUBRIAS, S. A.; CROWTHER, G. J.; SHANKLAND, E. G.; GRONKA, R. K.; CONLEY, K. E. Acidosis inhibits oxidative phosphorylation in contracting human skeletal muscle in vivo. *Journal of Physiol*ogy, v. 533, nº 2, pp. 589–599, 2003.

[75] KABBARA, A. A.; ALLEN, D. G. The use of the indicator fluo-5N to measure sarcoplasmic reticulum calcium in single muscle fibres of the cane toad. *Journal of Physiology*, v. 534, pp. 87-97, 2001.

[76] KIM, C. S.; COYNE, M. D.; GWATHMEY, J. K. Voltage-dependent calcium channel in ventricular cells of rainbow trout: effect of temperature changes in vitro. *American Journal Physiology Reg. Integrative Comp. Physiology*, v. 4, pp. R1524-R1534, 2000.

[77] KOPP, J.; LOOS, B.; SPILKER, G.; HORCH, R. Correlation between serum creatinine kinase levels and extent of muscle damage in electrical burns. *Burns*, v. 30, pp. 680-683, 2004.

[78] KRENDEL, M.; MOOSEKER, M. S. Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. *Journal of Physiology*, v. 20, pp. 239-251, 2005.

[79] KRISTENSEN, M.; ALBERTSEN, J.; RENTSCH, M.; JUEL, C. Lactate and Force production in skeletal muscle. *Journal of Physiology*, v. 562, nº 2, pp. 521-526, 2005.

[80] KUBO, K.; KANEHISA, H.; ITO, M.; FUKUNAGA, T. Effects of isometric training on the elasticity of human tendon structures in vivo. *Journal of Physiology*, v. 91, pp. 26-32, 2001.

[81] KÜHLBRANDT, W. Biology, Structure and Mechanism of P-Type ATPases. *Nature*, v. 5, pp. 282-295, 2004.

[82] LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. pH-sensitive microsphere delivery increases oral bioavailability of calcitonin. *Journal of Controlled Release*, v. 98, pp. 1-9, 2004.

[83] LAROCHE, M. Phosphate, the renal tubule, and the musculoskeletal system. *Joint Bone Spine*, v. 68, pp. 2111-2115, 2001.

[84] LASKOW, D. A.; CURTIS, J. J.; LUKE, R. G.; JULIAN, B. A.; DEIERHOI, M. H.; BARBER, W. H.; DIETHELM, A. G. Cyclosporine-induced changes in glomerular filtration rate and ureanext term excretion. *American Journal of Medicine*. v. 88, nº 5, pp. 497-502, 1990.

[85] LAVER, D. R.; O'NEILL, E. R.; LAMB, G. D. Luminal Ca^{2+}-regulated Mg^{2+} inhibition of skeletal RyRs reconstituted as isolated channels or coupled clusters.

Journal of General Physiology, v. 124, pp. 741–758, 2004.

[86] LIEBER, R. L.; FRIDEN, J. Clinical significance of skeletal muscle architecture. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 383, pp. 140-51, 2001.

[87] LO CONTE, L.; AILEY, B.; HUBBARD, T. J. P.; BRENNER, S. E.; MURZIN, A. G.; CHOTHIA, C. SCOP: A Structural Classification of Protein Database. *Nucleic Acids Research*, v. 28, pp. 257-259, 2000.

[88] LÖW, K.; CRESTANI, F.; KEIST, R.; BENKE, D.; BRÜNIG, I.; BENSON, J.; FRITSCHY, J.; RÜLICKE, T. Molecular and Neuronal Substrate for the Selective Attenuation of Anxiety. *Science*, v. 290, pp. 305-318, 2000.

[89] LUM, G.; LEAT-KHOURL, S. Significance of Low Serum Urea Nitrogen Concentrations. *Clinical Chemistry*. v. 35, n. 4, pp. 639-640, 1989.

[90] LWANGA, S. K.; LEMESHOW, S. *Sample Size Determination in Health Studies: a practical manual*. Geneva: World Health Organization, 1991.

[91] MACDONALD, W. A.; STEPHENSON, D. G. Effect of ADP on slow-twitch muscle fibres of the rat: implications for muscle fatigue. *Journal of Physiology*, v. 573, pp. 187-198, 2006

[92] MACINTOSH, B. R. Role of Calcium Sensitivity Modulation in Skeletal Muscle Performance. *News Physiological Science*, v. 18, pp. 222–225, 2003.

[93] MAITI, A.; BECKMANA, M. J. Extracellular calcium is a direct effecter of VDR levels in proximal tubule epithelial cells that counter-balances effects of PTH on renal Vitamin D metabolism. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 103, pp. 504–508, 2007.

[94] MENDELSSOHN, D.; BARRETT, B.; BROWNSCOMBE, L.; ETHIER, J.; GREENBERG, D.; KANANI, S.; LEVIN, A.; TOFFELMIRE, E. B. Elevated levels of serum creatinine: recommendations for management and referral. *Canadian Medical Association Journal*, v. 161, nº 4, pp. 413–417, 1999.

[95] MCCLELLAND, G. B.; DALZIEL, A. C.; FRAGOSO, N. M.; MOYES, C. D. Muscle remodeling in relation to blood supply: implications for seasonal changes in mitochondrial enzymes. *Journal of Experimental Biology*, v. 208, pp. 515-522, 2005.

[96] MILLAR, N. C.; HOMSHER, E. The effect of phosphate and calcium on force generation in glycerinated rabbit skeletal muscle fibres: a steady-state and transient kinetic study. *Journal of Biological Chemystry*, v. 265, pp. 20234-20240, 1990.

[97] MILLER, D. W.; SLOVIS, C. M. Hypophosphatemia in the Emergency Department Therapeutics. *The American Journal of Emergency Medicine*, v. 18, pp. 457-461, 2000.

[98] MINAMOTO, V. B. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. *Fisioterapia e Pesquisa*, v. 12, 2005.

[99] MORIMOTO, K.; SATO, K.; KASHIHARA, K.; HAYABARA, T. Increased Levels of mRNA for b- but not a-Subunit of Calmoduline Kinase II Following Kindled Seizures. *Brain Research Bulletin*, v. 43, n° 4, pp. 375–380, 1997.

[100] MORIN, L. P. Animal Issues Statement of the Society for Research on Biological Rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, v. 8, nº 2, pp. 97-106, 1993.

[101] MOTTA, V. T. *Bioquímica Clínica para o laboratório: princípios e interpretações*. 4ª ed. São Paulo: Robe Editorial, 2003.

[102] MUFFA, R.; BORNA, W.; LUTZB, T. A.; FISCHERA, J. A. Biological importance of the peptides of the calcitonin family as revealed by disruption and transfer of corresponding genes. *Peptides*, v. 25, pp. 2027–2038, 2004.

[103] MULLER, D.; KUEHNLE, K.; EGGERT, P. Increased Urinary Calcium Excretion in Enuretic Children Treated with Desmopressin. *Journal of Urology*, v. 171, pp. 2618–2620, 2004.

[104] NAGAYA, K. A.; TANAKA, S. B.; KITAJIMA, H. B., FUJIMURA, M. The corrected blood urea nitrogen predicts the developmental quotient of extremely low-birth-weight infants at the corrected age of 36 months. *Early Human Development*, v. 2781, pp. 7-11, 2006.

[105] ØRTENBLAD, N.; STEPHENSONJ, D. G. A novel signalling pathway originating in mitochondria modulates rat skeletal muscle membrane excitability. *Journal of Physiology*, v. 548, nº 1, pp. 139–145, 2003.

[106] OWEN, V. J.; LAMB, G. D.; STEPHENSON, D. G.; FRYER, M. W. Relationship between depolarization-induced force responses and Ca^{2+} content in skeletal muscle fibres of rat and toad. *Journal of Physiology*, v. 498, pp. 571–586, 1997.

[107] PALMER, G.; REEDIJK, J. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) Nomenclature of electron-transfer proteins. v. 267, pp. 665-677, 1992

[108] PANENIC, R.; GISIGER, V.; GARDINER, P. F. Fatigability of rat hindlimb muscles

after acute irreversible acetylcholinesterase inhibition. *Journal of Physiology*, v. 87, pp. 1455–1462, 1999.

[109] PERALTA, J.; AMANCIO, O. M. S. A creatina como suplemento ergogênico para atletas. *Revista de Nutrição*, v. 15, pp. 83-93, 2002.

[110] PETTE, D.; PEUKER, H.; STARON, R. S. The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 166, nº 4, pp. 261-77, 1999.

[111] POSTERINO, G. S.; FRYER, M. W. Mechanisms underlying phosphate-induced failure of Ca^{2+} release in single skinned skeletal muscle fibres of the rat. *Journal of Physiology*, v. 512, pp. 97-108, 1998.

[112] POSTERINO, G. S.; FRYER, M. W. Effects of high myoplasmic L-lactate concentration on E-C coupling in mammalian skeletal muscle. *Journal Applied of Physiology*, v. 89, pp. 517–528, 2001.

[113] ROBERGS, R. A.; ROBERTS, S. O. *Princípios fundamentais de fisiologia do exercício para aptidão, desempenho e saúde.* São Paulo: Editora Phorte, 2002.

[114] SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLEOD, S. A. Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Physical Therapy*, v. 81, pp. 1810-1816, 2001.

[115] SHELDON, G. F. Treatment of Hypophosphatemia. *Journal of Americal College of Surgeons*, v. 199, nº 1, pp. 171-181, 2004.

[116] SHIELS, H. A.; FARREL, A. P. The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing Ca^{2+} to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. *Journal Exp. Biology*, v. 200, pp. 1607-1621, 1997.

[117] SILVERTHORN, D.V. *Fisiologia Humana.* 2ª ed. São Paulo: Editora Manole, 2003.

[118] SOELLER, C.; CANNELL, M. B. Examination of the Transverse Tubular System in Living Cardiac Rat Myocytes by 2-Photon Microscopy and Digital Image–Processing Techniques. *Circulation Research*, v. 84, pp. 266-275, 1999.

[119] SPANGENBURG, E. E.; BOOTH, F. W. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 178, nº 4, pp. 413-24, 2003.

[120] STARON, R. S. Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Canadian Journal Applied Physiology*, v. 22, pp. 307-327, 1997.

[121] STEVENS, L.; BASTIDE, B.; KISCHEL, P.; PETTE, D.; MOUNIER, Y. Time-dependent changes in expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle. *American Journal Physiology*, v. 282, pp. C1025-C1030, 2002.

[122] STIENEN, G. J. M.; PAPP, Z.; ZAREMBA, R. Influence of inorganic phosphate and pH on sarcoplasmic reticular ATPase in skinned muscle fibres of Xenopus laevis. *Journal of Physiology*, v. 518, nº 3, pp. 735-744, 2000.

[123] STRAJB, M.; SHURKI, A.; WARSHEL, A. Converting conformational changes to electrostatic energy in molecular motors: The energetics of ATP synthase. *PNAS*, v. 100, nº 25, pp. 14834-14839, 2003.

[124] SYKES, B. D. Pulling the calcium trigger. *Nature Structural Biology*, v. 10, nº 8, pp. 588-589, 2003.

[125] TAYLOR, B. E.; HUEY, W. Y.; BUCHMAN, T. G.; BOYLE, W. A.; COOPERSMITH, C. M. Treatment of Hypophosphatemia using a protocol based on patient weight and serum phosphorus level in a surgical intensive care unit. *Journal of American College of Surgeous*. v. 198, nº 2, pp. 198–204, 2004.

[126] TENENHOUSE, H. S. Phosphate transport: Molecular basis, regulation and pathophysiology. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 103, pp. 572–577, 2007.

[127] TESI, C.; COLOMO, F.; PIRODDI, N.; POGGESI, C. The Effect of Inorganic Phosphate on Force Generation in Single Myofibrils from Rabbit Skeletal Muscle. *Biophysical Journal*. v. 78, pp. 3081–3092, 2000.

[128] TESI, C.; COLOMO, F.; PIRODDI, N.; POGGESI, C. Characterization of the cross-bridge force-generating step using inorganic phosphate and BDM in myofibrils from rabbit skeletal muscles. *Journal of Physiology*, v. 541, nº 1, pp. 187–199, 2002.

[129] TIPTON, K.; BOYCE, S. History of the Enzyme Nomenclature System. *Bioinformatics*. v. 16, pp. 34-40, 2000.

[130] UCHIDA, K.; GOTOH, A. Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clinica Chimica Acta*, v. 323, pp. 121-128, 2002.

[131] USHER-SMITH, J.A.; FRASER, J.A.; BAILEY, P.S.J.; GRIFFIN, J.; HUANG, C. The influence of intracellular lactate and H^+ on cell volume in amphibian skeletal muscle. *Journal of Physiology*, vol. 573, pp 799-818, 2006

[132] VAN DE GRAAF, S. F. J.; BOULLART, I.; HOENDEROP, J. G. J.; BINDEL, R. J.

M. Regulation of the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6 by 1α,25-dihydroxy Vitamin D_3 and dietary Ca^{2+}. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 89–90, pp. 303–308, 2004.

[133] VAN DER VELDEN, J.; KLEIN, L. J.; ZAREMBA, R; BOONTJE, N. M.; HUYBREGTS, M. A. J. M.; STOOKER, W; EIJSMAN, L. D.; VISSER, C. A. Effects of Calcium, Inorganic Phosphate, and pH on Isometric Force in Single Skinned Cardiomyocytes From Donor and Failing Human Hearts. *Circulation*, v. 1142, pp. 1140-1146, 2001.

[134] VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed, 2002.

[135] VORNANEN, M.; SHIELS, H.; FARRELL, A. P. Plasticity of excitation-contraction coupling in fish cardiac myocites. *Comp. Biochemical Physiol.*, v. 132, pp 827-846, 2002.

[136] WACKERHAGE, H.; HOFFMANN, U.; ESSFELD, D.; LEYK, D.; MUELLER, K.; ZANGE, J. Recovery of free ADP, Pi, and free energy of ATP hydrolysis in human skeletal muscle. *Journal Applied Physiology*, v. 85, pp. 2140-2145, 1998.

[137] WALTER, G.; VANDENBORNE, K.; ELLIOTT, M.; LEIGH, J. S. In vivo ATP synthesis rates in single human muscles during high intensity exercise. *Journal of Physiology*, v. 519, pp. 901-910, 1999.

[138] WAN, J.; POO, M. Activity-Induced Potentiation Developing Neuromuscular Synapses. *Science*, v. 285, pp. 1725-1728, 1999.

[139] WANG, H.; MACFARLANE, A.; COCHRANE, T. Isokinetic performance and shoulder mobility in elite volleyball athletes from the United Kingdom. *British Journal of Sports Medicine*. v. 34, pp. 39-43, 2000.

[140] WEBB, E. C. Enzyme Nomenclature: A Personal Retrospective. *The FASEB Journal*, v. 7, pp. 1192-1194, 1993

[141] WESTERBLAD, H.; ALLEN, D. G.; LÄNNERGREN, J. Muscle Fatigue: Lactic Acid or Inorganic Phosphate the Major Cause?. *News Physiology Science*, v. 17, pp. 17-21, 2002.

[142] WILLEMS, M. E. T.; STAUBER, W. T. Isometric and Concentric Performance of Electrically Stimulated Ankle Plantar Flexor Muscles in Intact Rat. *Experimental Physiology*, v. 84, pp. 379-389, 1999.

[143] WILLIAMS, G. N.; HIGGINS, M. J.; LEWEK, M. D. Aging Skeletal Muscle: Physiologic Changes and the Effects of Training. *Physical Therapy*, v. 82, pp. 62-68, 2002.

[144] WILMORE, J; COSTILL, D. L. *Fisiologia do Esporte e do Exercício*. São Paulo: Editora Manole, 2001.

[145] XIAO, M.; REIFENBERGER, J. G.; WELLS, A; BALDACCHINO, C.; CHEN, L. An action-dependent conformational change in myosin. *Nature structural Biology*, v. 10, nº 5, pp. 402-408, 2003.

[146] YAGI, N; HORIUTI, K.; TAKEMORI, S. Effects of inorganic phosphate on cross-bridge behavior after photorelease of ATP in permeabilized cells of rat skeletal muscle. *Pflügers Archives European Journal of Physiology*, v. 445, pp. 238-245, 2002.

[147] YAMAGUCHI, M. Role of Regucalcin in Calcium Signaling. *Life Sciences*, v. 66, nº 19, pp. 1769-1780, 2000.

[148] ZAR, J. H. *Bioestatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 1999.

[149] ZHANG, L. I; POO, M. Electrical activity and development of neural circuits. *Nature Neuroscience Supplement*, v. 4, pp. 1207–1214, 2001.

[150] ZHANG, S.; BRUTON, J. D.; KATZ, A.; WESTERBLAD, H. Limited oxygen diffusion accelerates fatigue development in mouse skeletal muscle. *Physiol*ogy. v. 4, pp. 551–559, 2006.

[151] ZHU, B.; ISHIDA, K; QUAN, L.; TANIGUCHI, M.; ORITANI, S.; LI, D.; FUJITA, M.; MAEDA, H. Postmortem serum uric acid and creatinine levels in relation to the causes of death. *Forensic Science International*, v. 125, pp 59-66, 2002.

Anexo A

As tabelas 1, 2, 3 e 4 demonstram os valores em triplicata, a média de cada animal e média do Grupo I (Controle) das dosagens séricas de uréia, creatinina, fosfato inorgânico e cálcio.

Tabela 1 – Grupo I (Controle) segundo valores de uréia

	Uréia (mg/dl)			
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	53	53	54	53,0
2	54	53	54	54,0
3	53	54	51	52,7
4	52	53	52	52,0
5	57	54	52	54,3
6	54	54	53	54,0
7	56	55	56	55,7
Média				**54**

Tabela 2 – Grupo I (Controle) segundo valores de creatinina

Creatinina (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	0,56	0,54	0,55	0,55
2	0,44	0,43	0,44	0,44
3	0,52	0,53	0,52	0,52
4	0,56	0,54	0,55	0,55
5	0,44	0,46	0,46	0,45
6	0,52	0,53	0,52	0,52
7	0,56	0,57	0,58	0,57
Média				0,52

Tabela 3 – Grupo I (Controle) segundo valores de fosfato inorgânico

Fosfato Inorgânico (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	4	3,8	3	3,6
2	3,4	3,3	3,4	3,4
3	6	6,2	7	6,4
4	4,6	4,5	4,6	4,6
5	4,3	4,2	4,3	4,3
6	5,5	5,5	5,6	5,5
7	5,3	5,4	5,3	5,3
Média				4,7

Tabela 4 – Grupo I (Controle) segundo valores de cálcio

Cálcio (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	9,1	9	9,2	9,1
2	9,1	9	8,6	8,9
3	8,6	8,8	8	8,5
4	8,9	8,6	9	8,8
5	8,7	8,6	8,8	8,7
6	9,3	9,2	8,8	9,1
7	8,3	8	7,8	8,0
Média				8,7

As tabelas 5, 6, 7 e 8 demonstram os valores em triplicata, a média de cada animal e média do Grupo II (K_3PO_4 0,5 mg/kg) das dosagens séricas de uréia, creatinina, fosfato inorgânico e cálcio.

Tabela 5 – Grupo II (K_3PO_4 0,5 mg/kg) segundo valores de uréia

Uréia (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	54	55	56	55,0
2	53	52	53	53,3
3	51	53	51	52,0
4	57	55	51	54,3
5	55	54	56	55,0
6	53	55	59	55,7
7	56	52	56	54,7
Média				54

Tabela 6 – Grupo II (K_3PO_4 0,5 mg/kg) segundo valores de creatinina

Creatinina (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	0,5	0,5	0,52	0,51
2	0,51	0,51	0,52	0,51
3	0,55	0,52	0,53	0,53
4	0,48	0,57	0,55	0,53
5	0,52	0,53	0,52	0,52
6	0,49	0,5	0,49	0,49
7	0,5	0,5	0,51	0,50
Média				0,51

Tabela 7 – Grupo II (K_3PO_4 0,5 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico

Fosfato Inorgânico (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	4	3,8	4,7	4,2
2	4,4	4,3	4,4	4,4
3	6	6,2	7	6,4
4	4,6	4,5	4,6	4,6
5	4,8	5,2	5,4	5,1
6	5,5	5,5	5,6	5,5
7	5,3	5,4	5,8	5,5
Média				5,1

Tabela 8 – Grupo II (K_3PO_4 0,5 mg/kg) segundo valores de cálcio

Cálcio (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	8,1	8	8,2	8,1
2	9,1	7,8	7,6	8,2
3	8,6	8,8	8	8,5
4	7,9	7,6	8	7,8
5	8,7	8,6	8,8	8,7
6	7,5	7,5	7,8	7,6
7	7,3	7	6,8	7,0
Média				8,0

As tabelas 9, 10, 11 e 12 demonstram os valores em triplicata, a média de cada animal e média do Grupo III (K_3PO_4 1,5 mg/kg) das dosagens séricas de uréia, creatinina, fosfato inorgânico e cálcio.

Tabela 9 – Grupo III (K_3PO_4 1,5 mg/kg) segundo valores de uréia

Uréia (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	53	54	55	54,0
2	53	53	54	53,3
3	51	52	51	51,0
4	51	56	54	53,7
5	54	55	54	54,0
6	55	55	56	55,0
7	51	51	52	51,0
Média				53

Tabela 10 – Grupo III (K_3PO_4 1,5 mg/kg) segundo valores de creatinina

Creatinina (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	0,6	0,5	0,55	0,55
2	0,46	0,47	0,47	0,47
3	0,55	0,52	0,53	0,53
4	0,57	0,57	0,58	0,57
5	0,56	0,54	0,55	0,55
6	0,42	0,44	0,42	0,42
7	0,52	0,53	0,52	0,52
Média				0,52

Tabela 11 – Grupo III (K_3PO_4 1,5 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico

Fosfato Inorgânico (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	5,8	5,7	5,5	5,7
2	5,4	5,8	5,7	5,6
3	6,6	6,5	5,9	6,3
4	6,2	6,6	6,4	6,4
5	5,9	6,3	6,3	6,2
6	6,1	6,8	5,8	6,2
7	7,1	6,3	6,4	6,6
Média				6,1

Tabela 12 – Grupo III (K_3PO_4 1,5 mg/kg) segundo valores de cálcio

Cálcio (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	7,7	7,2	7,5	7,5
2	7,5	7,6	7,2	7,4
3	6,9	6,6	7,1	6,9
4	7,8	7,7	7,9	7,8
5	7,1	7,4	7,4	7,3
6	7,4	7,8	7,7	7,6
7	7,2	6,8	7,1	7,0
Média				7,4

As tabelas 13, 14, 15 e 16 demonstram os valores em triplicata, a média de cada animal e média do Grupo III (K_3PO_4 2,5 mg/kg) das dosagens séricas de uréia, creatinina, fosfato inorgânico e cálcio.

Tabela 13 – Grupo IV (K_3PO_4 2,5 mg/kg) segundo valores de uréia

Uréia (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	54	55	55	55,0
2	56	55	55	55,0
3	53	53	51	53,0
4	51	55	52	52,7
5	59	54	52	55,0
6	51	53	52	52,0
7	57	55	56	56,0
Média				54

Tabela 14 – Grupo IV (K_3PO_4 2,5 mg/kg) segundo valores de creatinina

Creatinina (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	0,54	0,54	0,53	0,54
2	0,56	0,57	0,56	0,56
3	0,53	0,55	0,55	0,55
4	0,55	0,54	0,55	0,55
5	0,51	0,51	0,51	0,51
6	0,5	0,51	0,5	0,50
7	0,52	0,53	0,52	0,52
Média				0,53

Tabela 15 – Grupo IV (K_3PO_4 2,5 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico

Fosfato Inorgânico (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	7,7	7,3	7	7,3
2	7,2	7,3	7,3	7,3
3	6,9	7	7,2	7,0
4	6,9	6,9	5,3	6,4
5	7,4	6,8	7,2	7,1
6	5,5	5,4	5,9	5,6
7	7,1	7,1	6,9	7,0
Média				6,8

Tabela 16 – Grupo IV (K_3PO_4 2,5 mg/kg) segundo valores de cálcio

Cálcio (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	7,1	7,3	7,1	7,2
2	6,1	6,5	5,9	6,2
3	6,5	6,6	6,9	6,7
4	6,5	5,8	6,1	6,1
5	6,6	6,8	6,9	6,8
6	7,6	7,9	7,5	7,7
7	7	6,6	6,9	6,8
Média				6,8

As tabelas 17, 18, 19 e 20 demonstram os valores em triplicata, a média de cada animal e média do Grupo IV (K_3PO_4 5,0 mg/kg) das dosagens séricas de uréia, creatinina, fosfato inorgânico e cálcio.

Tabela 17 – Grupo V (K_3PO_4 5,0 mg/kg) segundo valores de uréia

Uréia (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	53	53	54	53,0
2	54	55	56	55,0
3	48	51	51	50,0
4	55	54	55	54,7
5	54	55	54	54,0
6	54	53	53	53,0
7	54	54	54	54,0
Média				53

Tabela 18 – Grupo V (K_3PO_4 5,0 mg/kg) segundo valores de creatinina

Creatinina (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	0,54	0,53	0,54	0,54
2	0,52	0,53	0,54	0,53
3	0,54	0,54	0,54	0,54
4	0,46	0,48	0,47	0,47
5	0,53	0,54	0,53	0,53
6	0,45	0,45	0,46	0,45
7	0,49	0,48	0,49	0,49
Média				0,51

Tabela 19 – Grupo V (K_3PO_4 5,0 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico

Fosfato Inorgânico (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	7,3	6,9	7,1	7,1
2	7,4	6,8	7,6	7,3
3	7	7,2	6,9	7,0
4	6,9	6,8	7,2	7,0
5	7,1	6,8	6,6	6,8
6	6,8	7,2	6,9	7,0
7	7,4	7,3	7,1	7,3
Média				7,1

Tabela 20 – Grupo V (K_3PO_4 5,0 mg/kg) segundo valores de cálcio

Cálcio (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	4,5	5,2	4,8	4,8
2	5,7	4,6	4,7	5,0
3	5,6	5,8	6,3	5,9
4	6	5,8	6,1	6,0
5	5,6	4,4	4,7	4,9
6	4,5	4,8	4,6	4,6
7	5,5	5,4	5,1	5,3
Média				5,2

As tabelas 21, 22, 23 e 24 demonstram os valores em triplicata, a média de cada animal e média do Grupo VI (K_3PO_4 7,5 mg/kg) das dosagens séricas de uréia, creatinina, fosfato inorgânico e cálcio.

Tabela 21 – Grupo VI (K_3PO_4 7,5 mg/kg) segundo valores de uréia

Uréia (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	53	53	54	53,0
2	53	54	53	53,0
3	55	55	56	55,0
4	51	53	52	52,0
5	52	52	52	52,0
6	54	57	55	55,0
7	53	53	52	53,0
Média				53

Tabela 22 – Grupo VI (K_3PO_4 7,5 mg/kg) segundo valores de creatinina

Creatinina (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	0,5	0,5	0,52	0,51
2	0,51	0,51	0,52	0,51
3	0,55	0,52	0,53	0,53
4	0,48	0,57	0,55	0,53
5	0,52	0,53	0,52	0,52
6	0,49	0,5	0,49	0,49
7	0,5	0,5	0,51	0,50
Média				0,51

Tabela 23 – Grupo VI (K_3PO_4 7,5 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico

Fosfato Inorgânico (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	5,1	5,7	5,4	5,4
2	6,8	5,8	6,4	6,3
3	6	6,4	6,6	6,3
4	6,9	7	6,5	6,8
5	6,6	6,8	6,6	6,7
6	6,1	7,7	6,4	6,7
7	7,4	6,8	7,2	7,1
Média				6,5

Tabela 24 – Grupo VI (K_3PO_4 7,5 mg/kg) segundo valores de cálcio

Cálcio (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	4,5	5,4	5,6	5,2
2	5,7	4,8	5,5	5,3
3	5,6	5,8	6,3	5,9
4	6,2	5,8	6,4	6,1
5	5,9	4,4	4,7	5,0
6	4,5	4,8	4,6	4,6
7	5,5	5,4	5,4	5,4
Média				5,4

As tabelas 25, 26, 27 e 28 demonstram os valores em triplicata, a média de cada animal e média do Grupo VII (K_3PO_4 10,0 mg/kg) das dosagens séricas de uréia, creatinina, fosfato inorgânico e cálcio.

Tabela 25 – Grupo VII (K_3PO_4 10,0 mg/kg) segundo valores de uréia

Uréia (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	51	52	52	52,0
2	53	51	52	52,0
3	54	52	53	53,0
4	55	54	54	54,0
5	53	53	53	53,0
6	54	54	55	54,0
7	55	55	56	55,0
Média				53

Tabela 26 – Grupo VII (K_3PO_4 10,0 mg/kg) segundo valores de creatinina

Creatinina (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	0,53	0,53	0,54	0,53
2	0,56	0,56	0,56	0,56
3	0,54	0,53	0,54	0,54
4	0,57	0,57	0,57	0,57
5	0,53	0,53	0,54	0,53
6	0,54	0,54	0,56	0,54
7	0,52	0,51	0,5	0,51
Média				0,54

Tabela 27 – Grupo VII (K_3PO_4 10,0 mg/kg) segundo valores de fosfato inorgânico

Fosfato Inorgânico (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	7,1	5,7	5,4	6,1
2	6,8	5,8	6,4	6,3
3	6	6,4	6,6	6,3
4	6,9	7	6,8	6,9
5	7,3	5,8	6,6	6,6
6	6,7	7,7	6,4	6,9
7	7,4	7,3	7,7	7,5
Média				6,7

Tabela 28 – Grupo VII (K_3PO_4 10,0 mg/kg) segundo valores de cálcio

Cálcio (mg/dl)				
Rato	**1**	**2**	**3**	**Média**
1	5,3	5,4	5,6	5,4
2	5,7	4,8	5,5	5,3
3	5,6	6,1	6,3	6,0
4	6,2	5,8	6,4	6,1
5	5,9	5,4	5,7	5,7
6	5,2	5,1	4,6	5,0
7	5,5	5,4	5,4	5,4
Média				5,6

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 20/2006**, relativo ao projeto intitulado "***Metodologia para avaliação da fadiga muscular baseada na alteração do fosfato inorgânico***", que tem como responsável **Alcimar Barbosa Soares** , está de acordo com as Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo ***Comitê de Ética em Experimentação Animal*** **(CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 08/2006.**

Este certificado expira-se em **9/ 08 / 2011.**

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 20/2006**, related to the project entitled "***Methodology for evaluation of the muscular fatigue based on the alteration of the inorganic phosphate***", under the supervision of **Alcimar Barbosa Soares**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the ***Ethics Committee in Animal Experimentation*** **(CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 9, 2006.**

This certificate expires in **August 9, 2011.**

Belo Horizonte, 9 de Agosto de 2006.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7048
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3409-4592 – Fax: (31) 3499-4597
www.ufmg.br/prpq/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)