

Revisão

As bases estruturais e moleculares da contração muscular

Structural and molecular bases of muscle contraction

Verônica Salerno Pinto*, Valéria Pereira de Sousa**, L. C. Cameron, D.Sc.***

.....

*Departamento de Biociências da Atividade Física - EEFD - Universidade do Brasil, **Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade do Brasil, ***Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro; PROCIMH – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro.

Resumo

O músculo esquelético é um sistema motor altamente organizado e regulado que transduz energia química proveniente da hidrólise de ATP em atividade mecânica. A miosina é capaz de promover a contração muscular através de interações cíclicas com a molécula de actina no filamento fino. O aumento da concentração de cálcio citoplasmático dispara a contração muscular num sistema regulado pela troponina e tropomiosina, proteínas que fazem parte do filamento fino. Nos diferentes músculos esqueléticos podem ser encontrados diferentes tipos de fibra: as fibras de contração rápida e as fibras de contração lenta, além de diferentes subtipos de fibras classificadas com base na cadeia pesada da miosina. Independente do tipo de fibra a interação das proteínas que formam o músculo esquelético com diferentes íons bem como com a molécula de ATP e seus produtos de hidrólise promovem mudanças estruturais que vão levar a contração da musculatura esquelética. Neste artigo revisamos os recentes achados bioquímicos, estruturais e funcionais do músculo esquelético.

Palavras-chave:

contração muscular, actina, miosina, complexo regulatório, filamento fino.

Abstract

Skeletal muscle is a highly organized and regulated motor system that transforms chemical energy from ATP hydrolysis into movement. Myosin is the motor protein that promotes the sliding of the thin filament due to its interaction with actin. Intracellular calcium increases triggers muscle contraction in a troponin-tropomyosin regulated system. Fast and slow-twitched fibers can be found in skeletal muscle as well as a different fiber subtype classification that is dependent on its myosin heavy chain expression. All fibers have the same structural changes in response to both ATP and ions binding that lead to muscle contraction and detachment. Here we will focus the state of art in structure, function and biochemistry of skeletal muscle.

Key-words:

muscle contraction, actin, myosin, regulatory complex, thin filament.

Recebido em 13 de janeiro de 2004; aceito 15 de junho de 2004.

Endereço para correspondência: Verônica Salerno Pinto, Av. Brigadeiro Trompowsky, S/N. Depto. Bioquímica Médica- ICB/CCS – Bloco H, 2º andar, Sala 010 – Cidade Universitária, Ilba do Fundão 21949-900 Rio de Janeiro RJ, E-mail: vspinto@bioqmed.ufrj.br

Introdução

A habilidade motora é uma das características fundamentais dos organismos vivos. O movimento esteve relacionado à vida desde o início dos tempos e nos organismos superiores os mecanismos pelos quais ocorre são diversos.

O músculo esquelético (ME) é o mais notável e evoluído sistema de controle de movimento que conhecemos. O ME é capaz de desenvolver trabalho a partir de transdução de energia química em mecânica de uma forma extremamente organizada.

Aspectos estruturais do músculo esquelético

O ME (Fig.1A) é constituído por fibras que se unem em cada extremo a um tendão, o qual por sua vez liga-se ao osso ou à aponeurose de outro músculo. Cada músculo, como estrutura macroscópica, age tipicamente em sistema de pares antagonistas, onde um relaxa e o outro contrai.

Algumas fibras musculares percorrem toda a extensão do músculo, outras, menores, encontram-se contidas dentro de pequenas estruturas denominadas fusos musculares. O fuso é um receptor que informará ao sistema nervoso central sobre o comprimento muscular.

As fibras musculares são formadas pela fusão de células precursoras chamadas de mioblastos, e conservam os núcleos destas, daí o seu aspecto multinucleado (Fig.1B). Assim como os motoneurônios, os miócitos formados não sofrem mitose. Durante o dano muscular proteínas existentes na lâmina basal sinalizam para que células-satélite distribuídas na lâmina basal migrem até o local de lesão e se diferenciem em mioblastos. Estes mioblastos se fundem formando novos miócitos para reconstituição da lesão.

Cada fibra muscular é envolvida por uma membrana contínua (sarcolema) e é eletricamente separada das outras fibras. Invaginações destas membranas para o interior da célula dão origem aos túbulos transversos (túbulos T – Fig. 2), uma rede de túbulos que passa por entre as miofibrilas [1]. Aproximadamente 80% do citoplasma da fibra muscular é ocupado por miofibrilas, que são consideradas as unidades contráteis da célula muscular. Os túbulos T estão em contato íntimo com um conjunto de cisternas (Fig. 2), o retículo sarcoplasmático, que se posiciona longitudinalmente as miofibrilas e é uma especialização do retículo endoplasmático encontrado em outras células. O retículo sarcoplasmático acumula cálcio dentro de suas cisternas por meio de uma Ca^{2+} ATPase que existe na membrana do retículo [2]. As fibras também contêm um grande número de mitocôndrias, que estão empacotadas entre as miofibrilas e se localizam periféricamente na fibra, próximo à membrana plasmática.

Vista ao microscópio ótico a célula muscular apresenta estriações em intervalos regulares. Esta estrutura estriada é demarcada por linhas, denominadas Z (Fig 1D). O espaço

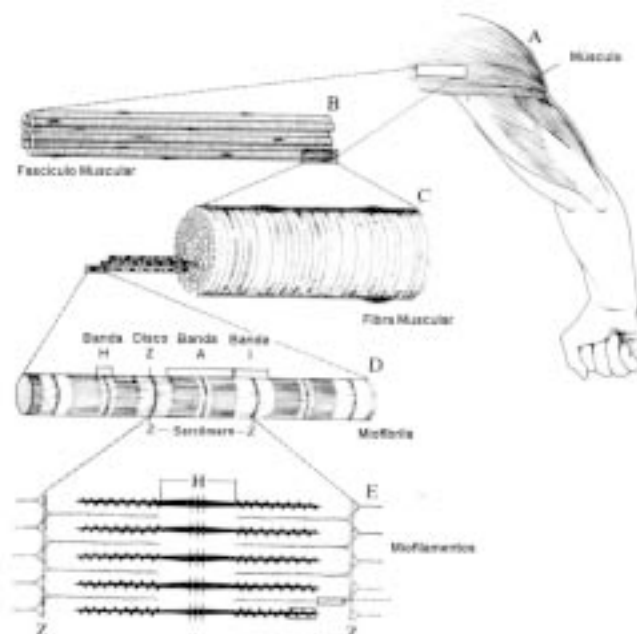
entre uma linha Z e outra é chamada de sarcômero e tem no seu interior regiões claras (banda I) e escuras (banda A) (Fig. 1D). No centro da banda A observa-se uma região mais clara denominada zona H (Fig 1E) [1].

Huxley [3] observou pela primeira vez a estrutura da célula muscular por difração de raios X e microscopia eletrônica e identificou a existência de filamentos finos e grossos. Propôs ainda que as bandas I eram formadas somente por filamentos finos e as bandas A eram formadas por sobreposição de filamentos finos e grossos. Esta estrutura foi confirmada pelo próprio Huxley em 1957, o que proporcionou a formulação de teorias mais precisas para explicar a contração muscular [4].

Tipos de fibras musculares

A diversidade do músculo esquelético foi reconhecida desde 1873 quando Ranvier [5] categorizou os músculos como “vermelho”, músculo de contração lenta, e como “branco”, músculo de contração rápida, baseando-se na aparência e na estimulação com corrente elétrica. Peter *et al.* [6] resumiram os tipos de fibras que estavam sendo propostos naquela década em tipos I e II, com um sistema de denominação bifuncional consistindo nas propriedades contráteis e capacidade oxidativa das fibras, mais especificamente fibras vermelhas de contração rápida têm velocidade de contração mais rápida que fibras vermelhas de contração lenta e capacidade oxidativa maior que músculo branco de contração rápida.

Figura 1 - Organização do músculo esquelético. (A) Músculo; (B) Fascículo Muscular; (C) Fibra Muscular; (D) Miofibrilas e (E) Sarcômero com os filamentos de miosina (filamentos grossos) e de actina (filamentos finos). (Adaptado de Bagshaw [1]).



Reiser *et al.* [7] e Staron & Pette [8] dentre outros, identificaram correlações entre a expressão de diferentes isoformas da cadeia pesada da miosina (*myosin heavy chain* - MHC), a velocidade de contração e atividade ATPásica, respectivamente. Com o advento da coloração histoquímica e imunohistoquímica de MHC, os tipos de fibras foram então classificados com base nas isoformas de MHC em tipo I “lenta vermelha”, tipo IIa “rápida vermelha”, e “rápida branca” foi categorizada em tipos IIx e IIb. Porém, em humanos apenas o tipo IIx é expresso [9].

Fibras musculares descritas como fibras lentas, tipo I ou fibras oxidativas lentas, têm sido caracterizadas como tendo altos níveis de isoformas de proteínas contráteis lentas, alto volume de mitocôndrias, altos níveis de mioglobina, alta densidade capilar, e capacidade oxidativa enzimática alta. Fibras musculares denominadas rápidas, IIa, ou fibras oxidativas rápidas, tem sido classicamente caracterizadas como exibindo um fenótipo de contração rápida, uma maior capacidade oxidativa e relativa resistência à fadiga. Essas fibras são conhecidas como tendo uma maior capacidade oxidativa que fibras tipo I de rato, mas não em seres humanos [10,11]. Fibras definidas como rápidas, ou IIx, IIb, ou fibras glicolíticas rápidas, têm baixa densidade de mitocôndrias, alta atividade das enzimas glicolíticas, alta atividade ATPásica da miosina, expressão aumentada de isoformas rápidas das proteínas contráteis, alta taxa de contração e baixa resistência à fadiga.

Com a descoberta da expressão heterogênea de MHCs numa mesma fibra e o advento da biologia molecular e métodos de mapeamento global, ficou evidente que existem mais de 4 categorias de expressão protéica no músculo esquelético. Baldwin e Haddad [12] sugeriram que a co-expressão de isoformas de MHC numa mesma fibra mostra uma subpopulação de fibras com alto potencial adaptativo, isto é, fibras híbridas são mais adaptadas a ter o fenótipo para atender as novas demandas funcionais. Tem sido demonstrada a capacidade de adaptação dos músculos a diferentes estímulos. Foi visto, por exemplo, que humanos não apresentam um aumento da expressão de MHC tipo I em fibras musculares tanto após um treinamento de força quanto de resistência. Porém a expressão de MHC tipo IIa é aumentada e tipo IIx diminuída [13,14,15]. Porém, atualmente é sabido que nem todas as proteínas musculares são alteradas em paralelo a expressão da isoforma de MHC. O controle do tipo de fibra muscular expressa depende de mecanismos que regulam a expressão de grupos de genes multifuncionais, não apenas de MHC, porque a funcionalidade de um tipo de fibra muscular é determinada por muitos grupos de genes funcionais.

Isso demonstra que o sistema de classificação atualmente utilizado para tipos de fibras musculares esqueléticas deve sofrer modificações num futuro próximo e passar a ter uma nomenclatura genômica, baseada em mudanças induzidas pela atividade contrátil em um fator

regulatório dentro de uma subpopulação de genes, nos quais as expressões são alteradas para modificar o fenótipo das fibras musculares [16].

Estrutura dos miofilamentos

Filamento grosso

A miosina (Fig. 3a) é o principal componente do filamento grosso, sendo esta proteína responsável pela atividade catalítica que converte energia química, sob a forma de ATP, na realização de trabalho motor. O ME contém em torno de 70-100 mg de miosina por grama de músculo (40-50% do total de proteínas musculares). Este trabalho motor é traduzido por alterações conformacionais e estruturais que a miosina sofre durante o ciclo de catálise [17]. Os filamentos grossos são formados por um arranjo antiparalelo de miosina, de tal modo que a porção central é lisa e formada apenas pela região em bastão das moléculas. A porção central corresponde à pseudozona H, localizada no centro da banda A.

A miosina II é uma molécula hexamérica com peso molecular de aproximadamente 520 kDa [18]. Esta proteína é constituída de duas cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias pesadas (MHC, *myosin heavy chain*, 200 kDa) e quatro cadeias denominadas cadeias leves (LC, *light chains*, 16-25

Figura 2 - Estrutura e organização dos túbulos T e do retículo sarcoplasmático em torno das miofibrilas.

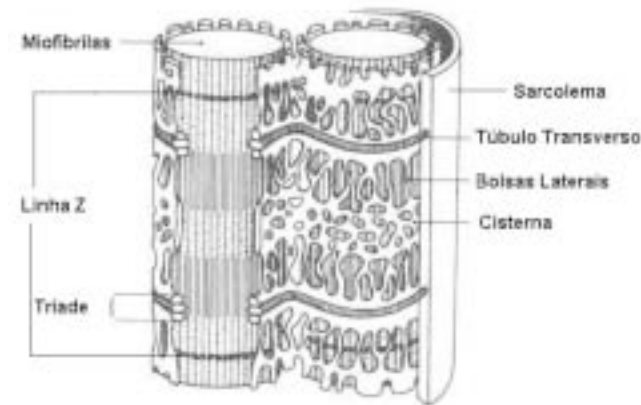


Figura 3 - Representação da molécula de miosina. (a) Molécula de miosina com suas cadeias leves: LC₁ e LC₃ (ELC); LC₂ (RLC). (b1) Clivagem proteolítica da miosina com quimotripsina e, (b2) Clivagem proteolítica da miosina com tripsina (Sellers & Goodson [19]).

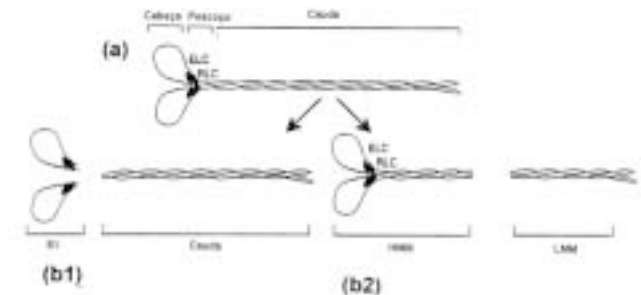


Figura 4 - Representação da molécula de actina por estrutura de fita. No centro da molécula pode ser visto o local de ligação do cátion (Mg^{++}) representado por um círculo e imediatamente acima a molécula de nucleotídeo (ATP) necessário para polimerização da actina. (Sheterline et al. [23])

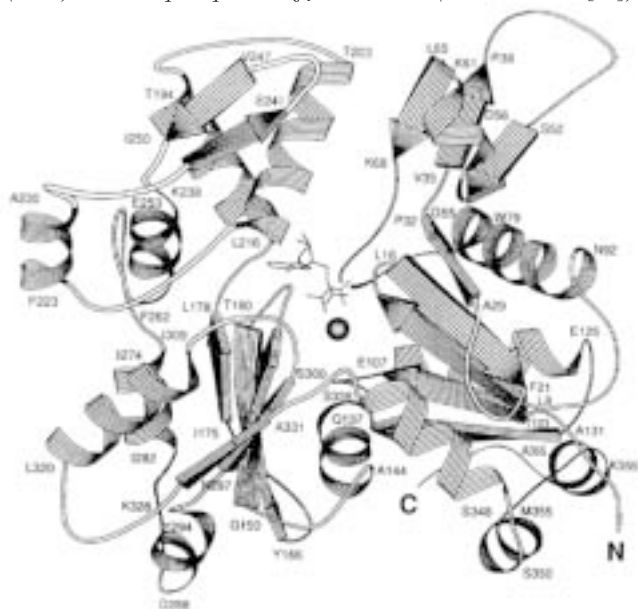
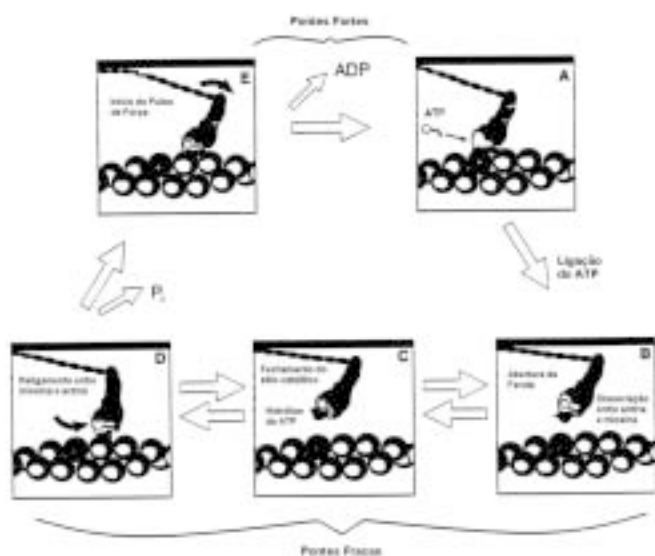
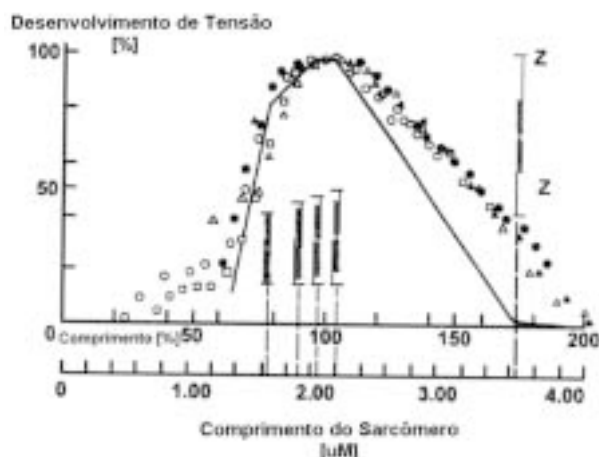


Figura 5 - Modelo de contração muscular (Sellers & Goodson [19]).



kDa) (Fig. 3a). A região N-terminal da cadeia pesada forma uma porção globular, ou região da cabeça da molécula, que contém os sítios para ligação de ATP e actina. As porções C-terminais das duas cadeias pesadas se associam para formar o domínio cauda, que é uma α -hélice superespiralada (*coiled-coil*); o que faz com que a miosina seja altamente assimétrica [19,20,17]. A molécula de miosina, com cerca de 150 nm comprimento, tem a forma de um bastão com projeção globular dupla em uma das extremidades, devido à conformação globular das cabeças de miosina. As cabeças

Figura 6 - Correlação de tensão em fibras isoladas com o comprimento do sarcômero (Herzog & Ait-Haddou [30]).



globulares se projetam para fora, próximas às extremidades das fibrilas.

As cadeias leves associadas à porção globular no ME são: cadeia leve alcalina 1 (LC₁, 25 kDa), cadeia leve DTNB-sensível, reguladora, ou cadeia leve 2 (LC₂, 20 kDa) e cadeia leve alcalina 2 (LC₃, 16 kDa) [19, 17]. No ME as LCs perderam a maioria de suas funções regulatórias e acredita-se que mantenham funções estruturais, mantendo a integridade da proteína.

A molécula de miosina contém regiões suscetíveis à clivagem proteolítica (Fig.3b). Através de digestão com tripsina ou quimotripsina pode-se obter os fragmentos HMM (meromiosina pesada e LC₁₋₃, 350 kDa) e LMM (meromiosina leve, 150 kDa) (Fig. 3b2). O fragmento dimérico maior (HMM) possui os sítios de ligação de actina e de hidrólise de ATP, e tem propriedades similares àquelas encontradas para miosina, porém é solúvel em baixa força iônica. A solubilidade da miosina, que requer alta força iônica, é determinada pela LMM, a região carboxi-terminal da proteína. A HMM pode ainda ser digerida em quatro subfragmentos: dois de S1 (subfragmento 1, 110 kDa) que preservam todas as atividades da miosina, e dois de S2 (subfragmento 2), que é a parte filamentosa da HMM [21,19]. A miosina pode ser clivada diretamente por quimotripsina em S1 e rod, que é o S2 mais a LMM (Fig. 3b1).

Filamento fino

Actina

Embora possa ser obtida na forma monomérica (G-actina), é na forma filamentosa que a actina exerce o seu papel na contração muscular (Fig. 6). Ao contrário da molécula de miosina os monômeros de actina são solúveis em baixa força iônica. A actina é o principal constituinte do filamento fino e forma uma família altamente conservada

de proteínas citoplasmáticas encontrada em todas as células eucarióticas. A G-actina é formada por uma cadeia polipeptídica com 375 resíduos de aminoácidos [22] com um peso molecular em torno de 45 kDa e altamente conservados na seqüência e no número de aminoácidos [22,23].

A polimerização da actina envolve a hidrólise de ATP e a ligação de um cátion divalente (Mg^{2+} ou Ca^{2+}) por cada dois monômeros, formando assim os filamentos de actina que permanecem com uma molécula de ADP e um cátion ligado por monômero [2,21,23,24].

Através de cristalografia de raios-X da G-actina (Fig. 4) e de difração de raios-X em fibras, foi possível mapear as regiões da interface entre actina e miosina. Com base nestes estudos foi demonstrado que cada cabeça de miosina interage com dois monômeros de actina, através de interações iônicas e hidrofóbicas estereoespecíficas, envolvendo resíduos do N e C-terminal da actina [22,23].

Mecanismo da contração muscular

As transformações quimio-mecânicas da miosina vêm sendo estudadas desde o início da década de 40. É um consenso que ocorre uma interação cíclica entre miosina (no filamento grosso) e actina (no filamento fino), causando o desenvolvimento de força e o deslizamento do filamento fino, acompanhado da hidrólise de ATP.

A miosina é capaz de hidrolisar $MgATP^{2-}$ lentamente quando não está interagindo com a actina, o que corresponde ao estado fisiológico de relaxamento. O ATP ligado à miosina é de fato rapidamente hidrolisado, gerando o intermediário M.ADP.Pi [25]. Porém, o Pi gerado, fosfato inorgânico, é liberado lentamente do sítio catalítico e a miosina permanece com ADP ligado, que também será liberado para que a miosina possa ligar uma nova molécula de ATP [25,26].

Quando a hidrólise de ATP pela miosina (S1) é medida na presença de actina, estamos nos aproximando sob o ponto de vista experimental, do processo da contração. Na ausência de ATP, miosina e actina estão fortemente ligadas, uma condição denominada de “estado de rigor”, caracterizada por interações ou pontes fortes. A adição de ATP à miosina rapidamente promove a redução da afinidade entre estas proteínas [27], o que leva a formação de pontes fracas, redução da afinidade da miosina pela actina e dissociação das proteínas. A miosina permanece ligada ao ATP (M.ATP), que será hidrolisado com a mesma velocidade observada na ausência de actina [28]. Após a hidrólise do ATP, o complexo M.ADP.Pi tem a afinidade por actina aumentada, o que promove a formação de pontes entre estas proteínas gerando o complexo AM.ADP.Pi. A ligação da actina promove a aceleração da saída do Pi [27]. A liberação do Pi acarreta a mudança conformacional produtora de trabalho, e actina e miosina passam a formar pontes fortes [29].

A Figura 5 correlaciona o esquema cinético com um modelo estrutural de interações entre miosina e actina, e

mostra um dos primeiros modelos elaborados após a publicação da estrutura do S1 por Rayment *et al.* [20]. Este modelo mostra que a comunicação entre os sítios de ligação de actina e de ATP é coordenada através da abertura e do fechamento de uma fenda existente na cabeça da miosina. No estado de rigor (A), a ligação de actina fecha a fenda e a miosina se liga à actina forte e estereoespecificamente. A ligação fraca de ATP ocorre em duas etapas. Inicialmente, a ligação de ATP leva à abertura da fenda, o que causa um decréscimo na afinidade da miosina por actina e leva à dissociação destas proteínas (B). Após esta etapa, o ATP se liga fortemente ao sítio catalítico, este sítio se fecha, e o ATP é hidrolisado, formando um estado conformacional mais estável, no qual ADP e Pi permanecem ligados. A hidrólise é acompanhada por mudanças na conformação da cabeça da miosina, fazendo com que o C-terminal se mova em direção ao sítio de ligação de actina (C). Esta mudança na conformação promove a formação de novas pontes fracas entre miosina e actina. Após estas etapas a miosina se liga novamente à actina, via interações eletrostáticas, que promovem uma ligação fraca (D). Em seguida, ocorre a liberação do Pi e a subsequente abertura do sítio de ligação de ATP (E) [26,19].

Os eventos bioquímicos que determinam a contração muscular e desenvolvimento de força são dependentes não só da hidrólise de ATP e da interação com a actina, mas também, do grau de interdigitação dos filamentos grossos e finos, e conseqüentemente do tamanho do sarcômero. O maior desenvolvimento de tensão é obtido quando o sarcômero tem o comprimento de 2 mM (Fig. 6). Quando há aumento ou diminuição deste comprimento ocorre decréscimo na força de contração (tensão). Este fato sugere que a produção de força esta diretamente relacionada à sobreposição dos miofilamentos [30].

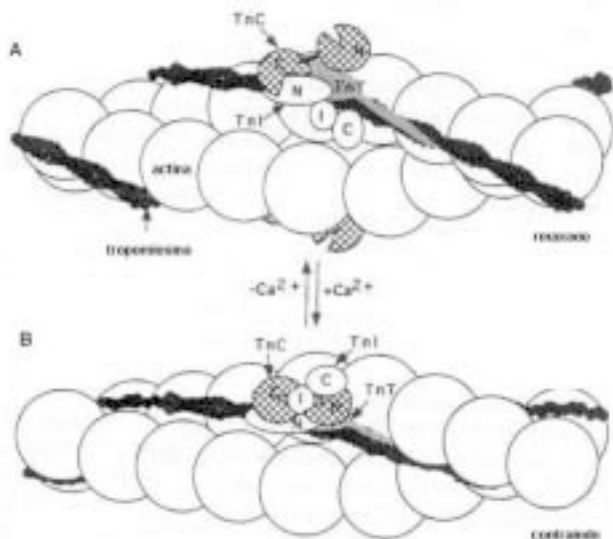
Complexo troponina-tropomiosina

A interação cíclica entre moléculas de actina e miosina ocorre sempre que houver ATP. Considerando que os níveis de ATP nas células são sempre mantidos constantes, é necessário que haja um sistema que regule a contração muscular, de forma que esta só ocorra quando o músculo for requisitado. O sistema que regula a atividade ATPásica acto-miosina no filamento fino do ME é o complexo troponina-tropomiosina (Tn-Tm). A organização destas proteínas no filamento se dá por uma série de unidades regulatórias repetidas: para cada sete monômeros de actina, uma troponina (Tn) e uma tropomiosina (Tm) (7:1:1) [31].

Tropomiosina

As moléculas de tropomiosina associam-se cabeça com cauda formando uma proteína filamentosa. Esse filamento

Figura 7 - A) Modelo da interação Tn-Tm-actina na ausência de Ca^{2+} , quando o domínio C-terminal da TnC está preenchido com Mg^{2+} e o N-terminal está livre. Nessa condição, a região N-terminal da TnI está ligada ao domínio C-terminal da TnC assim como à região C-terminal da TnT, enquanto o peptídeo inibitório e o C-terminal da TnI fazem contatos com a actina e Tm, mantendo o filamento fino na conformação que inibe a interação actomiosina. B) A ligação de Ca^{2+} no N-terminal da TnC aumenta a sua afinidade para o peptídeo inibitório e o C-terminal da TnI resultando no seu afastamento da actina e Tm. Isto permite a Tm adotar uma nova posição no filamento fino permitindo então a interação actomiosina o que resulta em contração. I, peptídeo inibitório (Farah & Reinach [56]).



formado situa-se ao longo do sulco das duas hélices de actina (Fig.7). Essa proteína tem como principal função no filamento fino mediar a ligação do complexo Tn à actina. A Tm possui duas subunidades denominadas a e b, que podem formar um homodímero ou um heterodímero [32]. A comparação das duas seqüências de aminoácidos revela uma alta similaridade, o peso molecular de ambas varia entre 33.000 – 35.000, e ambas possuem 284 resíduos de aminoácidos, dos quais 39 são diferentes. A razão da concentração das duas subunidades varia com o tipo de músculo; músculo rápido possui maior proporção de subunidade a, músculo lento possui uma proporção equimolar das duas subunidade e músculo cardíaco possui exclusivamente a subunidade a [33]. As duas subunidades da Tm, que possuem um alto conteúdo de α -hélice (~90%), se enrolam uma em torno da outra formando uma estrutura do tipo coiled-coil (hélice super-esprialada), assumindo uma forma filamentosa de aproximadamente 40 nm de comprimento. Essa estrutura é estabilizada primariamente por interações hidrofóbicas [34] e secundariamente por interações eletrostáticas [35]. Ocorre também uma ponte dissulfeto entre os dois resíduos de Cys-190 das duas cadeias da Tm quando esta é oxidada [32].

Complexo troponina

O complexo Tn é um complexo proteico formado por três subunidades: troponina T (TnT), troponina I (TnI) e troponina C (TnC), cada subunidade exerce uma função e em conjunto com a Tm regulam a interação contrátil entre a miosina e a actina (Fig. 7).

A TnT (~30,5 kDa) é a subunidade responsável pela ligação do complexo Tn à Tm [36,37]. A ligação da TnT à Tm se dá de forma antiparalela [38], ou seja, a porção N-terminal da TnT se liga à porção C-terminal da Tm. Tem sido mostrada uma outra função desta proteína: as isoformas da TnT (a e b) são capazes, juntamente com a TnC, de modular a sensibilidade da fibra muscular ao Ca^{2+} [39] e também atua cooperativamente na ativação da contração disparada por Ca^{2+} [40]. A TnT possui duas regiões chamadas TnT1, que compreende o N-terminal da TnT e liga à actina, tendo como função a de ativação cooperativa; e a TnT2 que engloba o C-terminal da proteína e é responsável por ligar a TnI-TnC à Tm. A TnT mantém o complexo Tn ligado ao filamento através da porção TnT1 de maneira independente de Ca^{2+} . Acredita-se que a porção TnT2 também atue na ligação da TnT à TnC-I e quando Ca^{2+} se liga à TnC, aumenta a ligação TnT-TnC enfraquecendo a ligação TnT2 a actina e a Tm. Este poderia ser um segundo sítio de regulação por Ca^{2+} no posicionamento da Tm no filamento fino [41,42].

A TnI (~21 kDa) é a chamada subunidade inibitória, essencial para inibir a formação de pontes entre a actina e a miosina na presença de ATP [43]. A TnI impede a produção de força e movimento através da inibição da atividade ATPásica da miosina, que ocorre devido a pontes formadas entre a miosina e a actina na presença de ATP [44-46]. O chamado peptídeo inibitório (pI) é a região responsável pela atividade inibitória da TnI [46]. O pI durante o repouso, possui um sítio de ligação na actina, que leva ao ancoramento da Tm no filamento de actina de forma a impedir, na ausência de Ca^{2+} , a formação do complexo acto-miosina. Essa inibição é revertida pelo aumento da sua ligação à TnC durante o processo de estímulo da contração.

A TnC (~18 kDa) é a subunidade que liga Ca^{2+} e dispara a contração muscular [47]. A TnC é uma proteína ácida altamente solúvel e pertence a uma superfamília de proteínas ligadoras de Ca^{2+} que são denominadas proteínas EF-hand. A cristalografia de TnC de peru e galinha demonstraram que a TnC possui dois domínios globulares, conectados por uma longa α -hélice central de 7 nm de comprimento, contendo 31 resíduos e formando nove voltas; sua estrutura se assemelha à de um hálter [48]. Cada domínio da TnC possui dois sítios que ligam Ca^{2+} . Os sítios I e II, que estão localizados no domínio N-terminal, ligam Ca^{2+} especificamente, mas com baixa afinidade ($K_{ca} = 2 \times 10^5 M^{-1}$). Os sítios III e IV, que se encontram no domínio C-terminal, são de baixa especificidade, ligam Ca^{2+} e Mg^{2+} , porém com alta afinidade

($K_{Ca} = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e $K_{Mg} = 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$), e são ocupados por um ou outro cátion divalente em condições fisiológicas [47]. Na fibra em repouso, o cátion ligado seria o Mg^{2+} , já que, nesta condição, a concentração de Ca^{2+} está abaixo de 10^{-7} M , enquanto que a de Mg^{2+} está em torno de 10^{-3} M . Durante a contração, o Mg^{2+} é substituído por Ca^{2+} [49]. Os quatro sítios de cálcio da TnC têm papéis primordiais, porém diferentes, quanto ao funcionamento da TnC. Os sítios I e II são sítios que regulam a contração muscular; os sítios III e IV são sítios que mantém a TnC ligada ao filamento fino e, por isso, chamados sítios estruturais [50-53].

Quando o Ca^{2+} se liga aos sítios I e II, abre-se uma cavidade hidrofóbica no domínio N-terminal. Uma cavidade hidrofóbica semelhante também é formada no C-terminal quando os sítios III e IV estão preenchidos. Essas cavidades parecem ser os sítios de interação da TnC com a TnI durante o estado de relaxamento do músculo.

Acredita-se que a ligação de Ca^{2+} nos sítios de baixa afinidade da TnC modifique a interação desta com a TnI, reduzindo a ação do peptídeo inibitório, pois induz uma mudança conformacional na TnC, expondo mais regiões hidrofóbicas desta. Esta mudança na conformação da TnC aumenta a ligação desta com a TnI e conseqüentemente, diminui a interação da TnI com a actina, e esta última fica livre para se ligar à miosina (Fig.7), ocorrendo assim a contração muscular [46,54,55].

Essas regiões de interação TnI-TnC foram confirmadas por Farah e Reinach [56], que demonstraram que, no complexo binário, a TnC e a TnI interagem de uma maneira antiparalela. As interações independentes de Ca^{2+} ocorrem entre a região N-terminal da TnI e a região C-terminal da TnC, o que já tinha sido demonstrado por Greaser e Gergely [57] e Potter e Gergely [36].

Mecanismo de regulação da contração muscular

A contração tem início quando o impulso nervoso é carregado ao longo do axônio do neurônio motor. Com a chegada do impulso nervoso, há a conseqüente despolarização da membrana pré-sináptica, que causa a fusão das vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica e exocitose da acetilcolina na fenda sináptica. A acetilcolina se liga aos seus receptores na membrana pós-sináptica, provocando a despolarização do sarcolema, dos túbulos T e do retículo sarcoplasmático (Fig. 2). Esses eventos provocam a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma em torno das miofibrilas, o aumento de Ca^{2+} no interior das fibras é em torno de 100 vezes; e a ligação de Ca^{2+} à TnC dispara a contração muscular.

O Ca^{2+} ocupa os sítios de baixa afinidade da TnC ocasionando a uma mudança conformacional na sua estrutura, o que irá aumentar a ligação entre a TnC e TnI, e diminuir a afinidade da TnI pela actina. O ancoramento da

Tm na actina fica enfraquecido; a Tm então gira, permitindo que a cabeça da miosina (S1) se ligue à actina (Fig. 7) [58,59]. A contração muscular ocorre através da energia fornecida pela hidrólise do ATP, como visto anteriormente.

O relaxamento ocorre quando o processo é revertido: cessado o estímulo, o nível de Ca^{2+} citosólico é diminuído devido a sua recaptação pelo retículo sarcoplasmático através de uma ATPase que depende de Ca^{2+} e Mg^{2+} presente na membrana, e o Ca^{2+} se dissocia da TnC, revertendo o complexo Tn-Tm à conformação original. Este é o modelo do impedimento estérico para a regulação da contração muscular, no qual a presença física do conjunto Tn-Tm é o que bloqueia a ligação da miosina à actina na ausência de Ca^{2+} , havendo dois estágios de ativação, que dependem de Ca^{2+} [58, 60]. Atualmente, existe também o modelo estérico de três estados, que propõe que a Tm teria três diferentes posições: bloqueada, parcialmente bloqueada e ligada, para a regulação do filamento fino [61]. Na ausência de Ca^{2+} , só haveria sítios para interações eletrostáticas entre actina e miosina; seria a chamada posição bloqueada. No momento que o Ca^{2+} é ligado a TnC, a Tm se moveria $\sim 25^\circ$ na superfície do filamento de actina, expondo vários potenciais sítios de interação entre actina e miosina; porém, a Tm continua bloqueando o acesso da miosina ao principal sítio de ligação. Essa posição da Tm é mantida por interações hidrofóbicas entre a Tm e a actina. Esse estado é chamado de parcialmente bloqueado. Para se estabelecer o estado ligado é necessário a ligação de Ca^{2+} na TnC e a forte ligação das cabeças de miosina na actina agindo em seguida para a Tm se mover mais 10° , expondo mais sítios de interação entre actina e miosina [62,63].

Conclusão

A regulação da atividade do ME é portanto uma cascata de sinais que se inicia no sistema nervoso central e termina no citoplasma muscular. Os eventos que permitem a continuidade da contração envolvem várias mudanças no meio interno da célula, assim como modificações conformacionais de proteínas em resposta a estas mudanças. A múltipla regulação do ME permite desta forma que este desenvolva diversas respostas macroscópicas a partir de sinais moleculares.

Referências

1. Bagshaw CR. Muscle Contraction. 2ª ed. London: Chapman & Hall; 1993. 155p.
2. Vianna AL. Contração muscular. In: Lacaz-Vieira F, Malnic G, eds. Biofísica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1981. p278-313.
3. Huxley HE. Electron microscope studies of the organization of the filaments in striated muscle. Biochim Biophys Acta 1953;12:387-98.

4. Huxley HE. The double array of filaments in cross-striated muscle. *J Biochem Cytol* 1957;3:631-8.
5. Ranvier L. Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. *C R Hebd Séanc Acad Sci (Paris)* 1873;77:1030-43.
6. Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 1972;11:2627-33.
7. Reiser PJ, Moss RL, Giulian GG, Greaser ML. Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J Biol Chem* 1985;260:9077-80.
8. Staron RS, Pette D. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. *Histochemistry* 1986;86:19-23.
9. Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M, Leinwand L, Schiaffino S. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 1994;267:C1723-C1728.
10. Baldwin KM, Klinkerfuss GH, Terjung RL, Mole PA, Holloszy JO. Respiratory capacity of white, red, and intermediate muscle: adaptive response to exercise. *Am J Physiol* 1972;222:373-8.
11. Essen B, Jansson E, Henriksson J, Taylor AW, Saltin B. Metabolic characteristics of fibre types in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1975;95:153-65.
12. Baldwin KM, Haddad F. Invited review: effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 2001;90:345-57.
13. Carter SL, Rennie CD, Hamilton SJ, Tarnopolsky M. Changes in skeletal muscle in males and females following endurance training. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79: 386-92.
14. Coggan AR, Spina RJ, King DS et al. Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60 to 70-yr-old men and women. *J Appl Physiol* 1992;72:1780-6.
15. Suter E, Hoppeler H, Claassen H. et al. Ultrastructural modification of human skeletal muscle tissue with 6-month moderate-intensity exercise training. *Int J Sports Med* 1995;16:160-6.
16. Spangenburg EE, Booth FW. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol. Scand* 2003;178:413-24.
17. Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 2000;1496:3-22.
18. Ohtsuki I, Maruyama K, Ebashi S. Regulatory and cytoskeletal muscle proteins of vertebrate skeletal muscle. *Adv Prot Chem* 1986;38:1-67.
19. Sellers JR, Goodson HV. Motor Proteins 2: Myosin. *Prot Prof* 1995;2:1323-1423.
20. Rayment I, Smith C, Yount RT. The active site of myosin. *Ann Rev Physiol* 1996;58:671-702.
21. Obinata T, Maruyama K, Sugita H, Kohama K, Ebashi S. Dynamic aspects of structural proteins in vertebrate skeletal muscle. *Musc Nerve* 1981;4:456-88.
22. Holmes KC, Kabsch W. Muscle protein: Actin. *Curr Opin Struct Biol* 1991;1:270-80.
23. Shterline P, Clayton J, Sparrow J. Actin. *Prot Prof* 1995;2:1-103.
24. Schüler H. Atpase activity and conformational changes in the regulation of actin. *Biochim Biophys Acta* 2001;549:137-47.
25. Taylor EW. Mechanism and energetics of actomyosin ATPase. In: Fozzard HA et al. *The Heart and cardiovascular system*. New York: Raven Press;1986. p.789-802.
26. Chalovich JM. Actin Mediated Regulation of Muscle Contraction. *Pharmac Ther* 1992;55:95-148.
27. Geeves MA. The dynamics of actin and myosin association and the crossbridge model of muscle contraction. *Biochem J* 1991;274:1-14.
28. Lymn RW, Taylor EW. Mechanism of Adenosine Triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* 1971;10:4617-24.
29. Goldman YE, Brenner B. Molecular mechanism of muscle contraction. *Ann Rev Physiol* 1987;49:629-36.
30. Herzog W, Ait-Haddou. Considerations on muscle contraction. *J Electr Kinesiol* 2002;12:425-33.
31. Potter JD. The content of troponin, tropomyosin, actin and myosin in rabbit skeletal muscle myofibrils. *Arch Biochem Biophys* 1974;162:436-441.
32. Bronson DD, Schachat FH. Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed, and slow skeletal muscles of the rabbit. *J Biol Chem* 1982;257:3937-44.
33. Hodges RS, Sodek J, Smillie LB, Jurasek L. Tropomyosin: amino acid sequence and coiled-coil structure, Cold Spring Harbor Symp. *Quant Biol* 1972;37:299.
34. Parry DAD. Analysis of the primary sequence of alpha-tropomyosin from rabbit skeletal muscle. *J Mol Biol* 1975;98:519.
35. Lehrer SS. Intramolecular crosslinking of tropomyosin via disulfide bond formation: evidence for chain register. *Proc Natl Acad Sci* 1975;72:3377-81.
36. Potter JD, Gergely J. Troponin, tropomyosin and actin interactions in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction. *Biochemistry* 1974;13:2697-2703.
37. Zot AS, Potter J. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Chem* 1987;16:535-59.
38. Chong PCS, Hodges RS. Photochemical crosslinking between rabbit skeletal troponin and alpha-tropomyosin. *J Biol Chem* 1982;257:9152-60.
39. Pan BS, Gordon AM, Potter JD. Two genetically expressed troponin T fragments representing a and b isoforms exhibit functional differences. *J Biol Chem* 1992;267: 23052-6.
40. Tobacman LS. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu Rev Physiol* 1996;58:447-81.
41. Pearlstone JR, Smillie LB. Binding of troponin-T fragments to several types of tropomyosin. Sensitivity to Ca²⁺ in the presence of troponin C. *J Biol Chem* 1982;257: 10587-92.
42. Pearlstone JR, Smillie LB. Effects of troponin-I plus-Com the binding of troponin-T and its fragments to alpha-tropomyosin: Ca²⁺ sensitivity and cooperativity. *J Biol Chem* 1983;258:2534-42.
43. Schaub MC, Perry SV. The relaxing protein system of striated muscle. Resolution of the troponin complex in inhibitory and calcium-sensitive factors and their relationship to tropomyosin. *Biochem J* 1969;115:993-1004.
44. Greaser ML, Gergely J. Reconstitution of troponin activity from these protein components. *J Biol Chem* 1971;246:4226-33.
45. Perry SV, Cole HA, Head JF, Wilson FJ. Localization and mode of action of the inhibitory protein component of the troponin complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1972;37:251-62.

46. Syska H, Wilkinson JM, Grand RJA, Perry SV. The relationship between biological activity and primary structure of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit. *Biochem J* 1976;153:375-87.
47. Potter JD, Gergely J. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 1975;250:4628-33.
48. Herzberg O, James MNG. Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin C at 2.8 Å resolution. *Nature* 1985;313:653-9.
49. Ruegg JC. Calcium in muscle activation. In: Burgreen W, Ishii S, Johansen K, Lauger H, Neuweiler G, Randal DJ, eds. Berlin: Springer-Verlag; 1986. 300 p.
50. Johnson JD, Charlton SC, Potter JD. A fluorescence stopped-flow analysis of Ca^{++} exchange with troponin C. *J Biol Chem* 1979;254:3497-502.
51. Johnson JD, Nakkula RJ, Vasulka C, Smillie LB. Modulation of Ca^{++} exchange with the Ca^{++} -specific regulatory sites of troponin C. *J Biol Chem* 1994;269:8919-23.
52. Robertson SP, Johnson JD, Potter JD. The time-course of Ca^{++} exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in Ca^{++} . *Biophys J* 1981;34:559-69.
53. Zot HG, Potter JD. A structural role for the Ca^{2+} - Mg^{2+} sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. *J Biol Chem* 1982;257:7678-83.
54. Weeks RA, Perry SV. Characterization of a region of the primary sequence of troponin C involved in calcium ion-dependent interaction with troponin I. *Biochem J* 1978;173:449-57.
55. Cachia PJ, Sykes BD, Hodges RS. Calcium dependent inhibitory region of troponin. A proton nuclear magnetic resonance study on the interaction between troponin C and the synthetic peptide N^a -acetyl [^{106}F]-TnI-(104-115) amide. *Biochemistry* 1983;22:4145-52.
56. Farah CS, Reinach FC. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J* 1995;9:755-67.
57. Greaser ML, Gergely J. Purification and properties of the components from troponin. *J Biol Chem* 1973;248:2125-33.
58. Huxley HE. Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1972;37:361-76.
59. Parry DAD, Squire JM. Structural role of tropomyosin in muscle regulation. Analysis of the X-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscle. *J Mol Biol* 1973;75:33-55.
60. Hitchcock SE, Huxley HE, Szent G et al. Calcium sensitive binding of troponin to actin-tropomyosin: a two-site model for troponin action. *J Mol Biol* 1973;80:825-36.
61. McKillop DF, Geeves MA. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys J* 1993;65:693-701.
62. McKillop DF, Geeves MA. Regulation of the actomyosin subfragment 1 interaction by troponin/tropomyosin. Evidence for control of a specific isomerization between two actomyosin subfragment 1 states. *Biochem J* 1991;279:711-8.
63. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 2000;80:853-924. ■