

Universidade Federal de São Carlos  
Departamento de Ciências Fisiológicas  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
(UFSCar/UNESP)

Rafael Zanelli Rissoli

Efeitos do exercício prolongado sobre a contratilidade  
cardíaca de uma espécie de peixe migratória,  
*Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae).

São Carlos

2018

Universidade Federal de São Carlos  
Departamento de Ciências Fisiológicas  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
(UFSCar/UNESP)

Rafael Zanelli Rissoli

Efeitos do exercício prolongado sobre a contratilidade  
cardíaca de uma espécie de peixe migratória,  
*Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae).

Tese apresentada ao Programa  
Interinstitucional de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas da Universidade  
Federal de São Carlos para a obtenção do  
título de Doutor em Ciências Fisiológicas

**Orientação:** Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin

São Carlos

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

Foiha de Aprovação


---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Rafael Zanelli Rissoli, realizada em 23/03/2018:




---

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues  
UFSCar



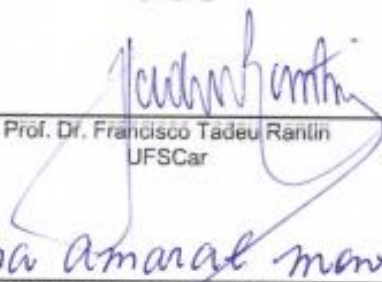
---

Prof. Dr. José Eduardo de Carvalho  
UNIFESP



---

Prof. Dr. Fernando Fabrizzi  
FUNEP



---

Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin  
UFSCar



---

Prof. Dra. Diana Amaral Monteiro  
UFSCar

Dedico este trabalho aos meus pais, Sandra Regina Cagliari Zanelli Rissoli e Washington Ângelo Rissoli e a minha irmã Taísa Zanelli Rissoli bem como à toda minha família, pelo incentivo, apoio e amor durante toda a minha vida. Ao meu amor, Mayris De Paula Silva, por me acompanhar durante todo o percurso do doutorado e compartilhar momentos tanto felizes quanto difíceis sem enjoar da minha cara.

## **AGRADECIMENTOS**

Á minha orientadora Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin, tanto por ter me concedido a oportunidade de sua orientação durante o mestrado e doutorado quanto pela a dedicação e confiança com as quais me conduziu durante grande parte da minha trajetória acadêmica.

Á Profa. Dra. Monica Jones Costa, minha orientadora durante a graduação e co-orientadora durante o mestrado, cujo exemplo e influência foram essenciais para o desenvolvimento de minha predileção pela Fisiologia e interesse pela carreira científica.

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, pela essencial participação durante a construção dos tanques de exercício para peixes e todo o auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cléo Alcântara Costa Leite por todas as contribuições e incentivos no decorrer do trabalho.

A todos os professores do programa de interinstitucional de pós-graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP (PIPGCF) por possibilitarem a expansão dos meus horizontes na área da Fisiologia e atuarem, também, como referências de conduta profissional.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) pela ajuda durante os experimentos, pelas discussões acadêmicas enriquecedoras, por tantos momentos agradáveis durante a rotina de laboratório e também de descontração: Carolina De Angelis, Profa. Dra. Diana Monteiro, Prof. Dr. Eliton Vasconcelos, Prof. Ms. Felipe Rocco Blasco, Prof. Ms. Lucas Ferro, Prof. Dr. Nathan Dias Martins, Ms. Nicolas Fernandes Martins, Dra. Raquel Fernanda Salla Ms. Vivian Maria Zeraik e William Fortes. Aos amigos e colegas do LZBC que também acompanharam e auxiliaram na minha trajetória na pós-graduação: André Guelli, Rafael Corrêa Cipriano, Thiago De Campos Belão e Juliana Montovani Thomaz. Aos amigos e colegas do LZBC por toda a ajuda no decorrer do doutorado e pelos momentos agradáveis durante as pausas para o café: Driele Tavares,

Grabriella Rocha, Marcelo Paulino, Marina Bonomo, Livia Duran, Pollyana Wenzel, Samantha Castro, Noele Leão.

Ao Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues bem como a equipe do Laboratório de Farmacologia Ariane Martinel, Júlio César, Teresa Cristina Buzinari e Thiago Moraes por prestar um auxílio essencial em questões metodológicas. Em especial aos colegas e amigos Cynthia Castro, Jorge Camargo e Karina Ana Silva pelo apoio valioso e a amizade durante o doutorado.

Aos técnicos administrativos (TAs) do departamento de ciências Fisiológicas da UFSCar (DCF) Alexandre, Carmen, Dona Graça e ao amigo Gustavo Oda por todo apoio durante a realização do trabalho. Agradeço especialmente ao Seu Angelo (Angelo Carnelosi) pela ajuda na construção dos tanques de exercício, durante a coleta dos peixes bem como pelos valiosos ensinamentos sobre hidráulica e elétrica.

Ao companheiro de república Pedro Victor Buck por participar de grande parte da minha trajetória durante a graduação e o doutorado e compartilhar momentos singulares. Ao também amigo e companheiro de república Renato Filogonio pelos diversos conselhos valiosos durante o doutorado e por consolidar a quinta-feira do porco assado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por conceder o amparo financeiro essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

## Resumo

O presente trabalho descreveu os efeitos de treinamento de exercício prolongado (60 dias) de diferentes intensidades 5 cm.s<sup>-1</sup> (EL), 10 cm.s<sup>-1</sup> (EM), 20 cm.s<sup>-1</sup> (EMI) e 30 cm.s<sup>-1</sup> (EI) sobre a massa ventricular relativa (MVR), contratilidade ventricular *in vitro* e a expressão de proteínas relacionadas com o processo de acoplamento (E-C) do tecido ventricular de *Brycon amazonicus*, uma espécie peixe muito ativa e que apresenta hábito migratório. A maioria das intensidades de exercício não induziu alterações na MVR, com exceção do grupo EMI onde presenciou-se uma redução neste parâmetro em relação ao seu respectivo grupo CT. Incrementos mais evidentes nos parâmetros contráteis como a força de contração (Fc), capacidade de bombeamento cardíaca (CBC) e na taxa de contração (R<sub>TPT</sub>) foram apresentados pelos grupos EL e EM, o que sugere que a espécie estudada apresentou adequações no desempenho contrátil em intensidades de exercício mais leves. Pode-se sugerir que as condições impostas pelos protocolos de exercício mais rigorosos (grupos EMI e EI) não propiciaram um incremento no desempenho contrátil. Os resultados indicaram que todos os grupos sofreram modulações no papel dos componentes do acoplamento E-C. O influxo de Ca<sup>2+</sup> via NCX se mostrou importante em todos os grupos exercitados, entretanto, o papel relativo do RS variou consideravelmente entre os grupos. No grupo EL a contribuição do RS foi essencial para a geração de força em uma ampla faixa de frequências de estimulação (0,2-1,8Hz) enquanto que nos grupos EM e EMI a contribuição do RS se mostrou relevante apenas em frequências elevadas (1,0-1,8Hz). No grupo EI a inibição funcional do RS não acarretou em reduções nos parâmetros contráteis em nenhuma das frequências analisadas, indicando que os LTCCs e o NCX assumiram o protagonismo durante a geração de força. Adicionalmente, os protocolos de exercício desencadearam diferentes taxas de expressão dos componentes do acoplamento E-C. O grupo EL apresentou maiores taxas de expressão do NCX e menores taxas de expressão da SERCA2, mas não apresentou alterações na expressão do PLB. O grupo EM apresentou maiores taxas de expressão do NCX e PLB, e menores taxas de expressão da SERCA2. Tanto o grupo EMI quanto o EI apresentaram elevações nas taxas de expressão dos LTCCs, NCX e SERCA2 mas não apresentaram alterações na expressão de PLB. Os dados gerados no presente trabalho revelaram que o processo de acoplamento E-C ventricular de *B. amazonicus* apresenta grande plasticidade em resposta ao exercício, podendo modular o papel relativo de seus componentes em conformidade com a intensidade do treinamento de exercício.

**Palavras chave:** Exercício natatório, peixe, contratilidade ventricular, expressão proteica, SERCA2, NCX, Canais L, fosfolambano, *Brycon amazonicus*.

## Abstract

The present work described the effects of exercise-training (60 days) at different intensities 5 cm.s<sup>-1</sup> (EL), 10 cm.s<sup>-1</sup> (EM), 20 cm.s<sup>-1</sup> (EMI) and 30 cm.s<sup>-1</sup> (EI) on relative ventricular mass (RVM), *in vitro* ventricular contractility and proteins expression of excitation-contraction coupling proteins in the ventricular tissue of *Brycon amazonicus*, a very active fish species with migratory habits. The majority of exercise intensities did not alter the RVM, except for the EMI group where a reduction was observed in relation to its respective CT group. EL and EM groups presented more relevant increases on ventricular force generation, suggesting that the studied species shows different adaptations in the capacity of contractile force generation (Fc) in the following the exercise intensity. It may be suggested that conditions imposed by the rigorous exercise protocols (EMI and EI groups) did not cause improvements in contractile performance. The present results indicate that all groups exhibited modulations of the E-C coupling components. The Ca<sup>2+</sup> influx via NCX was important in all groups, and the relative role of RS varied considerably between groups. In EL group, the RS contribution was essential for the force generation under a wide range of estimation frequencies (0.2-1.8Hz) whereas in the RS and EM and EMI groups the RS action was only relevant at high frequencies (1.0-1.8Hz). In the EI group, the functional inhibition of RS did not cause reductions in Fc values in all analyzes frequencies, indicating that the LTCCs and the NCX took the lead during the force generation. In addition, the exercise protocols triggered different expression rates of the E-C coupling components. The EL group presented higher NCX expression rates and lower SERCA2 rates, but did not alter PLB expression. The EM group presented higher expression rates of NCX and PLB, and lower SERCA2 rates. Both EMI and EI exhibited elevations in the LTCCs, NCX and SERCA2 expression rates but did not alter the PLB expression. The data generated in the present work revealed that the ventricular E-C coupling of *B. amazonicus* presents great plasticity in response to the exercise, modulating the relative roles of its components in accordance with the intensity of the exercise training.

**Keywords:** Swimming exercise, fish, ventricular contractility, protein expression, SERCA2, NCX, L-Type channels, phospholamban, *Brycon amazonicus*.



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. O coração de peixes teleósteos .....	1
1.2. Acoplamento excitação-contração (E-C) cardíaco .....	4
1.2.1. Modulações no processo de acoplamento E-C em resposta ao exercício .....	8
1.3. Breves considerações sobre exercício em peixes .....	9
1.4. Considerações sobre a espécie estudada .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
3.1. Exposição dos animais aos regimes de exercício natatório sustentado .....	15
3.2. Análise da função cardíaca <i>in vitro</i> .....	18
3.3. Western blotting .....	22
3.3.1. Homogeneização do músculo cardíaco .....	22
3.3.2. Quantificação de proteínas e preparação das amostras para eletroforese .....	22
3.3.3. Expressão proteica da SERCA2, PLB, NCX e LTCCs .....	23
3.4. Forma de Análise dos Resultados .....	25
3.5. Procedimentos Estatísticos .....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
4.1. Grupo de exercício leve (EL) .....	27
4.1.1. Resultados .....	27
4.1.2. Discussão .....	35
4.2. Grupo de exercício moderado (EM) .....	39
4.2.1. Resultados .....	39
4.2.2. Discussão .....	49
4.3. Grupos de exercício moderadamente intenso (EMI) e intenso (EI) .....	56
4.3.1. Resultados .....	56
4.3.2. Discussão .....	71
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	81
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	87
<b>8. APÊNDICE</b> .....	96

## Lista de Figuras

- Figura 1-** Painel A- Foto do coração de um exemplar de *Brycon amazonicus*. Painel B-Representação esquemática generalizada de um coração de um peixe teleósteo, as estruturas formadas por tecido muscular cardíaco estão representadas em vermelho e as estruturas formadas tecido muscular liso e tecido conectivo estão representadas em verde. .... 2
- Figura 2-** Representações esquemáticas do processo de acoplamento excitação-contração cardíaco de mamíferos (painel A) e peixes (painel B). As setas em vermelho indicam o movimento do íon  $Ca^{2+}$  durante a contração e as setas em preto indicam o movimento do  $Ca^{2+}$  durante o relaxamento do miócito. Brevemente, a excitação do miócito promove um influxo de  $Ca^{2+}$  via canais do tipo L (LTCC) e modo reverso do trocador  $Na^{+}/Ca^{2+}$  (NCX), o qual desencadeia a liberação de  $Ca^{2+}$ - $Ca^{2+}$  induzida pela abertura dos canais de rianodina (RyR) no retículo sarcoplasmático (RS). O  $Ca^{2+}$  é recrutado pelos miofilamentos durante a contração e, durante o relaxamento, é bombeado de volta para o RS pela  $Ca^{2+}$ -ATPase de retículo (SERCA2) ou conduzido para o meio extracelular pela ação do NCX e da bomba de  $Ca^{2+}$  da membrana plasmática (PMCA). .... 7
- Figura 3-**Exemplar de matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829). .... 11
- Figura 4-** A- Tanques de 500 L acoplados à motobombas utilizados na realização dos diferentes protocolos de exercício. B- Detalhe da corrente circular de água gerada pela motobomba, as setas vermelhas indicam o sentido da corrente. .... 16
- Figura 5-** A- Foto do coração de *B. amazonicus* com indicações da posição do átrio, bulbo arterial, ventrículo e o plano de secção do qual foram extraídas as fatias ventriculares. B- Fatia ventricular com indicação do plano de secção dos strips ventriculares, C- strip ventricular fixado entre dois anéis metálicos, um livre e outro preso a uma linha metálica, D- visão geral do strip ventricular fixado entre os anéis. .... 19
- Figura 6-** Diagrama representando um *strip* ventricular imerso em solução fisiológica e acoplado ao transdutor de força. **A-** estimulação elétrica capaz de desencadear uma contração, **B-** a tensão gerada pela contração é convertida em um sinal elétrico pelo transdutor de força e transmitido para o sistema de aquisição, **C-** o registro é gravado e analisado. .... 20
- Figura 7-** Exemplo de um registro de contração isométrica. Fc: Pico de tensão isométrica; TPT: tempo para o pico de tensão; TR50: tempo necessário para que ocorra 50% do relaxamento. .... 21
- Figura 8-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de força de contração (Fc-mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício leve (EL, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painel A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painel B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painel C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*). Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental. .... 28
- Figura 9-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC-mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício leve (EL, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painel A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painel B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painel C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de

estimulação, (\*). Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental..... 30

**Figura 10-** Valores (média  $\pm$  E.P.M) de força de contração ( $F_c$ -mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) e Exercício leve (EL, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os valores apresentados pelo grupo controle (CT, n=10) em condições padrão e após o tratamento com Lítio (CT+Li) e 10  $\mu$ M de Rianodina (CT+Ryan). Painei B- comparação entre os valores apresentados pelo grupo Exercício leve em condições padrão (EM, n=10) e após o tratamento com Lítio (EM+Li) e 10  $\mu$ M de Rianodina (EM+Ryan). (\*) indica diferença entre os grupos em condição padrão e grupo+Li, (#) diferença entre grupo padrão e grupo+Ryan. .... 31

**Figura 11-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) da taxa para pico de tensão ( $R_{TPT}$ -mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício leve (EL, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*). .... 32

**Figura 12-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) da taxa para 50% de relaxamento ( $R_{TR50}$ -mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício leve (EL, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*). .... 33

**Figura 13-** Comparação entre os valores médios das taxas de expressão do NCX, PLB e SERCA2 de tecido ventricular de *B. amazonicus* (n=6) dos grupos CT e EL. Valores são apresentados em unidades arbitrárias (U.A.  $\pm$  E.P.M) calculadas a partir da normalização das densidades ópticas obtidas para as proteínas analisadas em função dos valores de densidade de GAPDH das respectivas amostras. **A-** comparação entre as taxas de expressão do NCX. **B-** comparação entre as taxas de expressão do SERCA2. **C-** comparação entre as taxas de expressão da PLB. (#) indica diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os diferentes grupos..... 34

**Figura 14-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de força de contração ( $F_c$ -mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderado (EM, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*). Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental..... 41

**Figura 15-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC-mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderado (EM, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*). Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental..... 42

**Figura 16-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) da taxa para pico de tensão ( $R_{TPT}$ -mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderado (EM, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*). Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental. .... 44

**Figura 17-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) da taxa para 50% de relaxamento ( $R_{TR50}$ -mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderado (EM, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*). .... 45

**Figura 18-** Valores (média  $\pm$  E.P.M) de força de contração ( $F_c$ -mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) e Exercício moderado (EM, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os valores apresentados pelo grupo controle (CT, n=10) em condições padrão e após o tratamento com Lítio (CT+Li) e 10  $\mu$ M de Rianodina (CT+Ryan). Painei B- comparação entre os valores apresentados pelo grupo Exercício moderado em condições padrão (EM, n=10) e após o tratamento com Lítio (EM+Li) e 10  $\mu$ M de Rianodina (EM+Ryan). (\*) indica diferença entre os grupos em condição padrão e grupo+Li, (†) diferença entre grupo padrão e grupo+Ryan, (#) diferença entre grupo+Li e grupo+Ryan. .... 47

**Figura 19-** Contração pós-pausa (PRC-%  $F_c$ ) dos grupos CT (n=8) e EM (n=8) em condição padrão e após o tratamento com rianodina. Os valores obtidos após a pausa foram normalizados com os últimos valores apresentados antes da pausa de 30s (0,2Hz). Os valores estão apresentados em médias  $\pm$  E.P.M. Os símbolos indicam diferenças estatísticas  $P < 0,05$ , (\*) indica diferença entre EM e CT, (†) indica diferença entre EM e EM+Ryan, (#) indica diferença entre EM e CT+Ryan e (§) indica diferença entre CT e CT+Ryan. .... 48

**Figura 20-** Comparação entre os valores médios das taxas de expressão do NCX, PLB e SERCA2 de tecido ventricular de *B. amazonicus* (n=6) dos grupos CT e EM. Valores são apresentados em unidades arbitrárias (U.A.  $\pm$  E.P.M) calculadas a partir da normalização das densidades ópticas obtidas para as proteínas analisadas em função dos valores de densidade de GAPDH das respectivas amostras. **A-** comparação entre as taxas de expressão do NCX. **B-** comparação entre as taxas de expressão do SERCA2. **C-** comparação entre as taxas de expressão da PLB. (#) indica diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os diferentes grupos. .... 49

**Figura 21-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de força de contração ( $F_c$ -mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=10) e Exercício intenso (EI, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos CT, EMI e EI em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de verapamil (grupo+Vera). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de KBR-7493 (grupo+KBR). Painei D- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*) indica diferença entre CT e EMI, (#) diferença entre CT e EI, (&) diferença entre EMI e EI. Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental. .... 59

**Figura 22-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC-mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=10) e Exercício intenso (EI, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painel A- comparação entre os grupos CT, EMI e EI em condição padrão. Painel B- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de verapamil (grupo+Vera). Painel C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de KBR-7493 (grupo+KBR). Painel D- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística (P < 0,05) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*) indica diferença entre CT e EMI, (#) diferença entre CT e EI, (&) diferença entre EMI e EI. Os marcadores em branco indicam diferença estatística (P < 0,05) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental. .... 61

**Figura 23-** Valores (média  $\pm$  E.P.M) de força de contração (Fc-mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=10) e Exercício intenso (EI, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painel A- comparação entre os valores apresentados pelo grupo controle (CT, n=10) em condições padrão e após o tratamento com 10  $\mu$ M Verapamil (CT+Vera), 10  $\mu$ M de KBR-7493 (CT+KBR) e 10  $\mu$ M de Rianodina (CT+Ryan). Painel B- comparação entre os valores apresentados pelo grupo Exercício moderadamente intenso (EMI, n=10) em condições padrão e após o tratamento com 10  $\mu$ M Verapamil (EMI+Vera), 10  $\mu$ M de KBR-7493 (EMI+KBR) e 10  $\mu$ M de Rianodina (EMI+Ryan). Painel C- comparação entre os valores apresentados pelo grupo Exercício intenso (EI, n=10) em condições padrão e após o tratamento com 10  $\mu$ M Verapamil (EI+Vera), 10  $\mu$ M de KBR-7493 (EI+KBR) e 10  $\mu$ M de Rianodina (EI+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística (P < 0,05) entre diferentes grupos experimentais (CT, EMI ou EI) na mesma frequência de estimulação, (\*) indica diferença entre os grupos em condição padrão e grupo+Vera, (#) diferença entre grupo padrão e grupo+KBR, (§) diferença entre grupo padrão e grupo+Ryan, (&) diferença entre grupo+Vera e grupo+Ryan, (+) diferença entre grupo+Vera e grupo+KBR, (o) diferença entre grupo+KBR e grupo+Ryan. Os marcadores em branco indicam diferença estatística (P < 0,05) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental. .... 64

**Figura 24-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) da taxa para pico de tensão (R<sub>TPT</sub>-mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=10) e Exercício intenso (EI, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painel A- comparação entre os grupos CT, EMI e EI em condição padrão. Painel B- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de verapamil (grupo+Vera). Painel C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de KBR-7493 (grupo+KBR). Painel D- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística (P < 0,05) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*) indica diferença entre CT e EMI, (#) diferença entre CT e EI, (&) diferença entre EMI e EI. Os marcadores em branco indicam diferença estatística (P < 0,05) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental. .... 66

**Figura 25-** Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) da taxa para 50% de relaxamento (R<sub>TR50</sub>-mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=10) e Exercício intenso (EI, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painel A- comparação entre os grupos CT, EMI e EI em condição padrão. Painel B- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de verapamil (grupo+Vera). Painel C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de KBR-7493 (grupo+KBR). Painel D- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística (P < 0,05) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*) indica diferença entre CT e EMI, (#) diferença entre CT e EI, (&) diferença entre EMI e EI. Os marcadores em branco indicam diferença estatística (P < 0,05) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental. .... 68

**Figura 26-** Comparação entre os valores médios das taxas de expressão do NCX, PLB e SERCA2 e LTCCs de tecido ventricular de *B. amazonicus* (n=6) dos grupos CT, EMI e EI. Valores são apresentados em unidades arbitrárias (U.A. ± E.P.M) calculadas a partir da normalização das densidades ópticas obtidas para as proteínas analisadas em função dos valores de densidade de GAPDH das respectivas amostras. **A-** comparação entre as taxas de expressão do NCX. **B-** comparação entre as taxas de expressão do PLB. **C-** comparação entre as taxas de expressão da SERCA2. **D-** comparação entre as taxas de expressão dos LTCCs (#) indica diferença estatística (P < 0,05) entre os diferentes grupos CT e EMI. (&) indica diferença estatística (P < 0,05) entre os diferentes grupos CT e EI. .... 70

**Figura 27-** Representações esquemáticas do processo de acoplamento excitação-contração cardíaco de *Brycon amazonicus* nos seguintes protocolos A- Controle (CT), B- Exercício leve (EL), C- Exercício moderado (EM), D- Exercício moderadamente intenso (EMI) e E- Exercício intenso (EI) bem como o resumo dos resultados obtidos para cada grupo. As setas em vermelho indicam o movimento do íon  $Ca^{2+}$  durante a contração e as setas em preto indicam o movimento do  $Ca^{2+}$  durante o relaxamento do miócito. Brevemente, a excitação do miócito promove um influxo de  $Ca^{2+}$  via canais do tipo L (LTCC) e modo reverso do trocador  $Na^{+}/Ca^{2+}$  (NCX), o qual desencadeia a liberação de  $Ca^{2+}$ - $Ca^{2+}$  induzida pela abertura dos canais de rianodina (RyR) no retículo sarcoplasmático (RS). O  $Ca^{2+}$  é recrutado pelos miofilamentos durante a contração e, durante o relaxamento, é bombeado de volta para o RS pela  $Ca^{2+}$ -ATPase de retículo (SERCA2) ou conduzido para o meio extracelular pela ação do NCX e da bomba de  $Ca^{2+}$  da membrana plasmática (PMCA). .... 86

### Lista de Tabelas

**Tabela 1-** Valores de massa (Wb) e comprimento (Lb) corpóreos e de massa ventricular relativa (MVR) dos grupos experimentais CT e EL, antes e depois dos 60 dias experimentais. .... 27

**Tabela 2-** Valores de massa (Wb – g) e comprimento (Lb – cm) corpóreas dos grupos experimentais CT e EM, antes e depois dos 60 dias experimentais. .... 39

**Tabela 3-** Valores (média ± E.P.M) de massa (g) dos grupos Controle (CT, n=16) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=16) e Exercício intenso (EI, n=16) antes e após os protocolos experimentais bem como as porcentagens de aumento apresentadas por cada grupo. .... 56

**Tabela 4-** Valores (média ± E.P.M) de comprimento (cm) dos grupos Controle (CT, n=16) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=16) e Exercício intenso (EI, n=16) antes e após os protocolos experimentais bem como as porcentagens de aumento apresentadas por cada grupo. .... 57

## Lista de Abreviaturas

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
$[Ca^{2+}]_i$	Concentração Intracelular de $Ca^{2+}$
CBC	Capacidade de Bombeamento Cardíaco
CC	Comprimentos Corpóreos
CICR	Liberação de $Ca^{2+}$ - $Ca^{2+}$ induzida
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CT	Controle
E-C	Excitação-Contração
EI	Exercício Intenso
EL	Exercício Leve
EM	Exercício Moderado
EMI	Exercício Moderadamente Intenso
EPOC	<i>Excess Post-exercise oxygen consumption</i>
Fc	Força de Contração
$f_H$	Frequência Cardíaca
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
KBR	Fármaco KB-R7493
Lb	Comprimento Corpóreo
Li	Lítio
LTCCs	Canais de $Ca^{2+}$ do tipo L
$[Na^+]_i$	Concentração Intracelular de $Na^+$
mN	Milnewtons
MVR	Massa Ventricular Relativa
NCX	Trocador $Na^+/Ca^{2+}$
PA	Potencial de Ação
PCR	Técnica <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLB	Fosfolambano
PCR	<i>Post-rest contraction</i>
PMCA	Bomba da $Ca^{2+}$ da membrana plasmática
RS	Retículo Sarcoplasmático

RTPT	Taxa de Contração (Fc/TPT)
RTR50	Taxa de Relaxamento (Fc/TR50)
Ryan	Rianodina
RyR	Receptores de Rianodina
SERCA2	Bomba da $\text{Ca}^{2+}$ do Retículo Sarcoplasmático
	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de
	Laboratório
SBCAL	
TPT	Tempo para Pico de Tensão
TR50	Tempo para 50% do Relaxamento
U.A.	Unidade Arbitrária de Densidade Óptica
Vera	Fármaco Verapamil
Wb	Massa Corpórea



## 1. INTRODUÇÃO

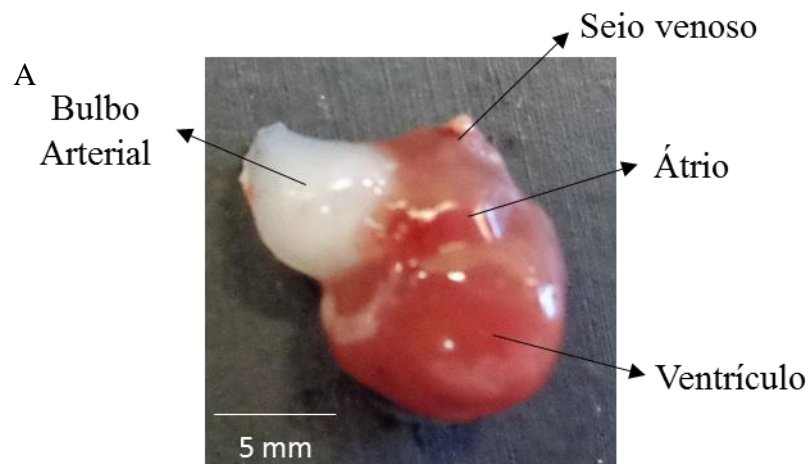
### 1.1. O coração de peixes teleósteos

Assim como em todos os vertebrados, o coração de peixes teleósteos é o órgão central do sistema circulatório responsável por gerar pressão que, conduzido através do sistema vascular fechado, possibilita o fluxo sanguíneo capaz de promover o transporte de nutrientes, gases respiratórios, metabólitos, hormônios, células de defesa imunitária, além possibilitar de a distribuição e dissipação calor, promovendo, portanto, integração entre todos sistemas do organismo (STEPHENSON; ADAMS; VACCAREZZA, 2017). A atuação desse órgão como uma bomba é promovida pelo ciclo cardíaco, um processo sequencial de contrações (sístoles) e relaxamentos (diástoles) das câmaras cardíacas que promove o recebimento e ejeção do sangue em seu interior (OLSON, 2011). O coração de teleósteos está localizado na porção ventral do organismo, situando-se frontalmente em relação à nadadeiras peitorais e à cavidade peritoneal e, na maioria das espécies, entre os órgãos respiratórios bilaterais denominados brânquias (FARRELL; PIEPERHOFF, 2011). A maioria das espécies apresenta um sistema circulatório denominado simples, onde o sangue percorre uma trajetória unidirecional, não retornando ao coração após irrigar o órgão respiratório (FARRELL, 2011). Portanto, ao ser ejetado pelo coração, o fluxo de sangue percorre primeiramente as brânquias, onde as células sanguíneas captam oxigênio da água, e é imediatamente conduzido para circulação sistêmica, desta forma, de forma que apenas o sangue pouco oxigenado atravessa as câmaras cardíacas (FARRELL, 2011b).

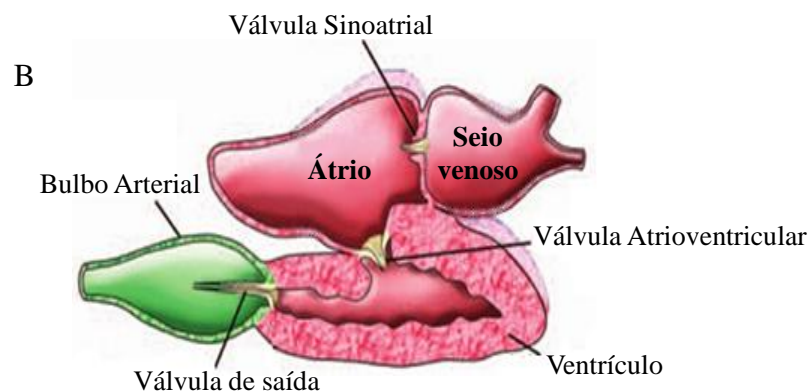
Como pode ser visto na Figura 1 (A e B), o coração do matrinxã (*Brycon amazonicus*), assim como da maioria das espécies de teleósteos, é composto por quatro câmaras distintas que se apresentam unidas anatomicamente em série: o seio venoso, o átrio, o ventrículo e o bulbo arterial (SEDMERA; WANG, 2012). De forma distinta ao coração tetracavitário apresentado por mamíferos, que possui dois átrios e dois ventrículos contráteis, o coração de teleósteos

possui três câmaras contráteis, o seio venoso, o átrio e o ventrículo (STEPHENSON; ADAMS; VACCAREZZA, 2017). O seio venoso é uma câmara de paredes delgadas, composta por musculatura lisa e aglomerados de músculo cardíaco; que se conecta em uma de suas extremidades às veias da circulação sistêmica e na outra ao átrio, sendo responsável pela acomodação do sangue para a entrada no átrio (GRIMES; KIRBY, 2009). Em peixes, o seio venoso apresenta capacidade contrátil, o que contribui substancialmente para o preenchimento do átrio (JENSEN et al., 2014)

Figura 1- Paineis A e B - Foto do coração de um exemplar de *Brycon amazonicus*. Paineis A e B - Representação esquemática generalizada de um coração de um peixe teleosteo, as estruturas formadas por tecido muscular cardíaco estão representadas em vermelho e as estruturas formadas por tecido muscular liso e tecido conectivo estão representadas em verde.



Fonte: RISSOLI 2018.



Fonte: Adaptado de GRIMES; KIRBY, 2009.

Na junção entre o seio venoso e o átrio situa-se o canal sinoatrial onde está presente um conjunto de células marca-passo, ou tecido nodal, responsável pela gênese de potenciais de ação (PAs) que, por sua vez, desencadeiam a contração das câmaras cardíacas mediante a ativação do acoplamento excitação contração (E-C) (descrito nas próximas seções), sendo propagados primeiramente para o átrio e em seguida para o ventrículo (VORNANEN, 2017). Na junção entre o seio venoso e o átrio consta a válvula sino atrial, cuja a função é bloquear a junção entre as duas câmaras durante a contração atrial, impedindo, assim, que o sangue seja ejetado para o seio venoso com a contração átrio (ICARDO; COLVEE, 2011).

O átrio, por sua vez, compreende uma câmara formada por uma única camada muscular, fina em comparação ao ventrículo, que não apresenta irrigação coronariana. As paredes internas do átrio possuem pequenas saliências por toda sua extensão denominadas trabéculas. Tais estruturas promovem um aumento da superfície de troca entre a musculatura atrial e o sangue venoso que ocupa o lúmen da câmara, possibilitando a captação direta de O<sub>2</sub> e nutrientes do sangue (SEDMERA; WANG, 2012). Com a contração atrial o sangue é, então, conduzido para o ventrículo e a válvula atrioventricular impede que o fluxo sanguíneo retorne ao átrio (FARRELL; PIEPERHOFF, 2011).

O ventrículo é a câmara contrátil que apresenta a musculatura mais espessa possuindo, desta forma, a maior capacidade de ejeção. Em matrinxã, assim como outros peixes neotropicais ativas como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macroporum*) o ventrículo apresenta um formato piramidal (SIMÕES et al., 2002; THOMAZ, 2011), o que favorece do desenvolvimento de níveis mais elevados de pressão (GENGE; HOVE-MADSEN; TIBBITS, 2012). Ademais, de forma similar ao átrio, as paredes do ventrículo também apresentam trabéculas ao longo de toda a câmara, entretanto, a densidade destas estruturas é muito maior em comparação ao átrio. Em decorrência desta disposição trabecular bem como da união frouxa entre seus miócitos, a porção interna da câmara ventricular assume uma

constituição esponjosa sendo denominado de miocárdio esponjoso (FARRELL; PIEPERHOFF, 2011).

Como mencionado anteriormente, esta disposição favorece a captação de direta de O<sub>2</sub>, entretanto, no ventrículo, a disposição trabecular também auxilia na acomodação do sangue a ser ejetado (PIEPERHOFF; BENNETT; FARRELL, 2009). A porção mais externa que envolve o ventrículo é composta por uma segunda camada muscular que difere da porção esponjosa por apresentar miócitos unidos firmemente e dispostos em um padrão regular, denominado miocárdio compacto. Esta camada é irrigada por capilares coronários e, salvo exceções, é especialmente desenvolvida em espécies de peixe que desempenham nado vigoroso (FARRELL, 2011b). Portanto, tal característica possivelmente está relacionada a necessidade de uma maior oxigenação do miocárdio em virtude das maiores demandas metabólicas impostas pelo exercício (FARRELL, 2002). Segundo THOMAZ (2011), a miocárdio ventricular matrinxã apresenta uma musculatura compacta dotada de vasos coronários abundantes e bem desenvolvidos, o que também pode estar relacionado com o grande desempenho de nado da espécie.

Ao ser ejetado pelo ventrículo o sangue atravessa a válvula de saída e penetra no bulbo arterial, e, por fim, atinge a aorta ventral. O bulbo arterial uma câmara elástica dotada de paredes espesas de músculo liso e tecido conectivo que protege os vasos branquiais de variações amplas de pressão e prolonga o fluxo sanguíneo na aorta ventral durante a sístole ventricular (GRIMES; KIRBY, 2009).

## **1.2. Acoplamento excitação-contração (E-C) cardíaco**

O acoplamento (E-C) é uma sequência de eventos que culmina na geração de força contrátil nos cardiomiócitos. Como descrito anteriormente, a ação autonômica de um grupo de células marca-passo nodais gera PA, que ao atingirem um miócito, atuam tanto sobre canais de

$\text{Ca}^{2+}$  da sarcolema, os canais lentos de  $\text{Ca}^{2+}$  (canais tipo L ou LTCCs), quanto sobre trocadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) em seu modo reverso, promovendo um pequeno influxo passivo de  $\text{Ca}^{2+}$  para meio intracelular, o que desencadeará o processo de contração muscular (BERS, 2008). Entretanto, apesar deste pequeno influxo ser essencial para o acoplamento E-C em todos os grupos de vertebrados, de forma geral, existem diferenças marcantes na estrutura celular apresentada pelos diferentes grupos que determinam a origem e a extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  durante cada contração (SCRIVEN; MOORE, 2012).

Em animais endotérmicos, principalmente mamíferos, o aparato contrátil se dispõe em fibras musculares espessas, com uma pequena razão superfície/volume (e menor área de superfície relativa), que são cortadas por várias projeções delgadas da sarcolema, os túbulos T. Quando em repouso, o miócito apresenta a grande fração da  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular retida no interior de uma rede intracelular membranosa, o retículo sarcoplasmático (RS), que apresenta em sua superfície canais especializados na liberação deste íon para o citoplasma denominados canais sensíveis a rianodina do tipo II (RyR) (LANNER et al., 2010).

Quando a pequena concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente, que adentrou via canais L e NCX (atuando em seu modo reverso), se liga aos sítios específicos situados na superfície dos canais de RyR, tem início um processo denominado liberação de  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$ -induzida (CICR), onde este íon promove a abertura dos canais de RyR e, conseqüentemente, a liberação de grande quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS para o sacorplasma. O  $\text{Ca}^{2+}$  liberado irá então se ligar às subunidades C da troponina, promovendo o deslizamento da actina sobre a miosina que gera a contração muscular (EISNER et al., 2012).

Posteriormente, para que ocorra o relaxamento, o  $\text{Ca}^{2+}$  previamente liberado pelo RS é ativamente reconduzido para seu interior através de uma bomba presente em sua membrana, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA2a) que, por sua vez, é regulada mediante a fosforilação de uma proteína aderida na mesma membrana, o fosfolambano (PLN). A pequena parcela de  $\text{Ca}^{2+}$  remanescente, que adentrou via túbulos T, é reconduzida ao meio extracelular principalmente

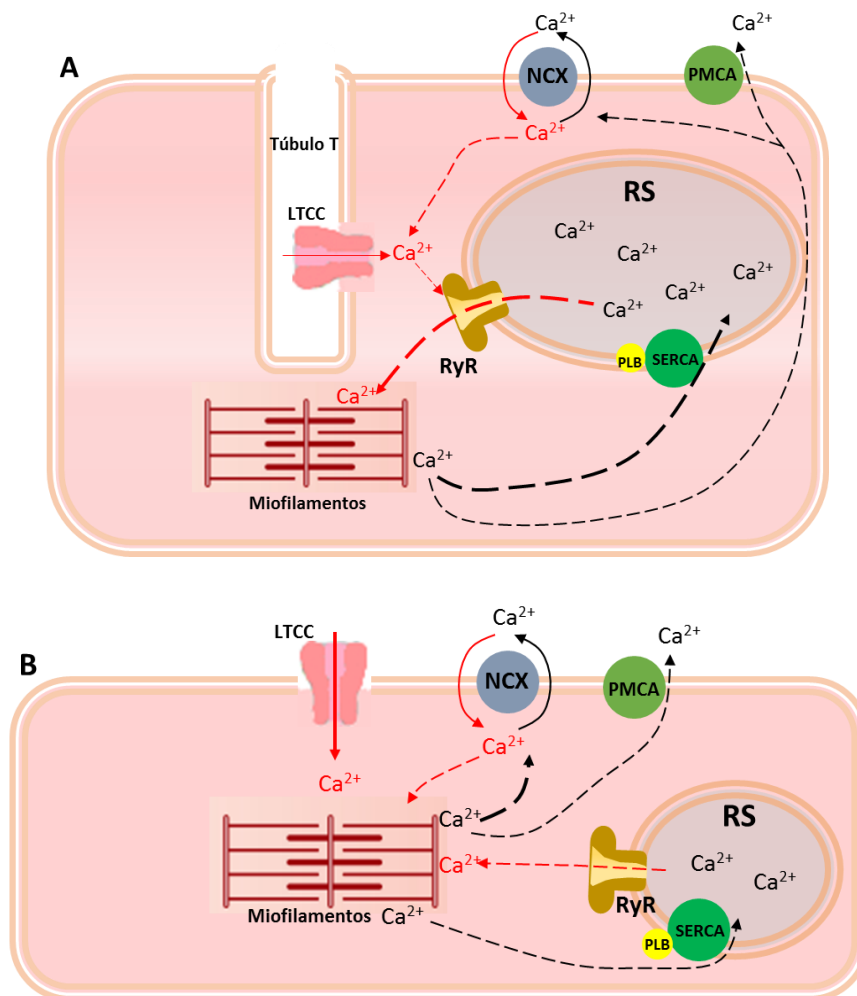
pelo NCX e, em menor grau, por uma  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase presente na sarcolema (PMCA) (BERS, 2000).

Entre os ectotérmicos, no entanto, existem distinções no processo de E-C não apenas em relação ao modelo descrito para endotérmicos, mas também uma grande diversidade intraespecífica (VORNANEN; HAVERINEN, 2013). Em muitas espécies de ectotérmicos, que incluem répteis, anfíbios e peixes, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular já é suficiente para promover as ativações contráteis, sem que o RS atue de forma significativa (GALLI; TAYLOR; SHIELS, 2006; GILLIS; TIBBITS, 2002). Para tanto, o aparato contrátil destes animais se dispõe em fibras musculares mais delgadas e com uma grande superfície relativa, o que confere uma menor distância de difusão entre os meios intra e extracelular. Adicionalmente, apresentam uma série de características que refletem essa aquisição extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , como um RS pouco desenvolvido anatomicamente, ausência de túbulos-T e miofilamentos situados periféricamente, próximos à sarcolema (TITTU; VORNANEN, 2001). Na Figura 2 contam as representações esquemáticas do processo de excitação-contração cardíaco de mamíferos (Figura 2A) e peixes (Figura 2B).

Contudo, trabalhos que submeteram preparações *in vitro* de tiras ventriculares à rianodina, um alcalóide que promove a abertura irreversível dos canais de RyR do RS, relataram a existência de uma grande participação do RS no processo de contração de diversas espécies de peixes filogeneticamente distintas. Destaca-se que a força contrátil desenvolvida por tiras ventriculares de espécies muito ativas como a cavala do Pacífico (*Scomber japonicus*, HOUTTUYN, 1782) e o atum de nadadeira amarela (*Thunnus albacares*, Bonnaterre, 1788) sofreu reduções de 20% e 50%, respectivamente, quando expostas à rianodina (SHIELS et al., 1999; SHIELS; FARRELL, 2000), sugerindo a existência de uma relação entre a grande demanda do sistema circulatório destas espécies e o papel relativo do RS no acoplamento E-C cardíaco (ROCHA; RANTIN; KALININ, 2007; SHIELS et al., 2011).

Deve-se ressaltar, entretanto, que tiras ventriculares de traíra (*Hoplias malabaricus*, Bloch, 1794), uma espécie sedentária, e de lampreia de rio (*Lampetra fluviatilis*, Linnaeus, 1758), uma espécie de peixe filogeneticamente basal em relação aos teleósteos, também apresentaram grandes reduções da força contrátil quando expostas à rianodina, o que impede uma correlação direta entre o nível de atividade e/ou a posição filogenética e a parcela de contribuição do RS para as contrações (RIVAROLI; RANTIN; KALININ, 2006; VORNANEN; HAVERINEN, 2013).

Figura 2- Representações esquemáticas do processo de acoplamento excitação-contracção cardíaco de mamíferos (painel A) e peixes (painel B). As setas em vermelho indicam o movimento do íon  $\text{Ca}^{2+}$  durante a contracção e as setas em preto indicam o movimento do  $\text{Ca}^{2+}$  durante o relaxamento do miócito. Brevemente, a excitação do miócito promove um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais do tipo L (LTCC) e modo reverso do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), o qual desencadeia a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela abertura dos canais de rianodina (RyR) no retículo sarcoplasmático (RS). O  $\text{Ca}^{2+}$  é recrutado pelos miofilamentos durante a contracção e, durante o relaxamento, é bombeado de volta para o RS pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo (SERCA2) ou conduzido para o meio extracelular pela acção do NCX e da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática (PMCA).



### 1.2.1. Modulações no processo de acoplamento E-C em resposta ao exercício

Além das diferenças interespecíficas no acoplamento E-C cardíaco citadas, muitos estudos vêm apontando a existência de uma grande plasticidade desse processo em resposta a situações que impõe uma demanda aumentada sobre a função cardíaca, como longos períodos de exercício. Estudos sobre a análise molecular, por Western blot, do músculo cardíaco de camundongos e ratos que foram submetidos a exercício aeróbico diário indicaram uma clara elevação na transcrição de proteínas dos LTCCs, SERCA2a, PLN e de canais de RyR, o que, como sugerido pelos autores, poderia proporcionar uma melhoria do desempenho contrátil dos miócitos frente a maior demanda circulatória (MOLANO; MEG, 1995; MORÁN; SABORIDO; MEGÍAS, 2003; ROLIM et al., 2007).

Apesar de já terem sido relatadas diversas adaptações do sistema circulatório em diferentes espécies de peixes frente ao exercício prolongado, como aumentos no volume sistólico (FARRELL; JOHANSEN; SUAREZ, 1991), no hematócrito (GALLAUGHER et al., 2001), na irrigação tecidual (SANGER; POTSCHER, 2000) e até mesmo no tamanho ventricular relativo (DAVISON, 1997), pouco ainda se sabe a respeito do efeito do treinamento sobre a capacidade de geração de força do aparato contrátil. CASTRO et al. (2013) encontraram indícios de que o salmão do Atlântico (*Salmo salar*, Linnaeus, 1758) pode apresentar incrementos no processo de acoplamento E-C ao ser submetido a um regime de 10 semanas de exercício contínuo. Tais autores, através da utilização de técnicas de PCR em tempo real, avaliaram, entre outros marcadores, as taxas de expressão de genes também ligados ao manejo cardíaco de  $Ca^{2+}$ , como os que codificam subunidades de canais L (alpha D1), SERCA2a, canais de RyR, além da proteína de ligação FK-506, que regula a função de canais de RyR, e da calsequestrina 1, encontrando valores de expressão mais elevados de LTCCs, proteína de ligação FK-506 e da calsequestrina (mas não da SERCA2a e RyR) nos animais submetidos a um regime de exercício rigoroso (submetidos a uma corrente artificial com velocidade aproximada de  $20 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Tais achados levaram os autores a concluir que tal modulação pode



estar relacionada com a melhoria da maquinaria contrátil do coração em resposta ao exercício. DINDIA; ALDERMAN; GILLIS (2017) verificaram que a exposição de truta arco-íris ao exercício aeróbico contínuo ( $1,7 \text{ CC}\cdot\text{s}^{-1}$  por 4, 7 e 14 dias) desencadeou aumentos significativos na expressão tanto de proteínas contráteis quanto das relacionadas à integridade celular já após 4 dias de exposição. Entretanto, quando a exposição ao exercício se estendeu para 14 dias, os autores descreveram uma redução na abundância de proteínas ligadas às vias de produção de energia como a glicólise,  $\beta$ -oxidação e na cadeia transportadora de elétrons, indicando uma redução no investimento na manutenção de tais processos. Tais achados indicam que não apenas a intensidade, mas também o tempo de exposição ao exercício podem influenciar as modulações apresentadas por peixes no acoplamento E-C cardíaco.

### **1.3. Breves considerações sobre exercício em peixes**

Quando em seu ambiente natural, a atividade natatória de um peixe é essencial para o desempenho de funções ecológicas com forrageio, fuga de predadores, busca por ambientes mais favoráveis e reprodução (NELSON et al., 2002). A atividade locomotora é, fundamentalmente, um produto da atividade mecânica da musculatura esquelética, sendo que exercício em peixes pode ser definido como um processo ativo de ação motora natatória capaz de elevar a demanda de  $\text{O}_2$  e nutrientes neste tecido (RODNICK; PLANAS, 2016). Portanto, uma maior atividade do sistema circulatório se torna essencial durante eventos de exercício, uma vez que os aumentos na demanda metabólica impõe uma elevação no fluxo sanguíneo muscular (MCKENZIE, 2011).

Em condições laboratoriais ou de cultivo, o método comumente utilizado para expor peixes a diferentes intensidades e períodos de exercício consiste em submeter os animais à fluxos de água que podem ser controlados (KIEFFER, 2010). Tal método é possível em virtude de muitas espécies de peixe apresentarem um comportamento reflexo denominado reotaxia, se orientando espontaneamente contra a corrente d'água quando expostas a ela (MCKENZIE,

2011). O treinamento de exercício pode ser definido como um período de esforço natatório capaz de desencadear respostas adaptativas nos peixes. Durante o cultivo, muitas espécies de peixe apresentam respostas positivas frente ao treinamento de exercício como maiores taxas de crescimento e ganho de massa, aumento apetite e redução na agressividade de cardumes, embora tais respostas sejam dependentes da espécie, alimentação e intensidade do treinamento (DAVISON, 1997).

Peixes apresentam dois tipos principais de musculatura esquelética distintas anatômica e funcionalmente: a musculatura branca e a musculatura vermelha. A musculatura branca ocupa a maior fração da musculatura do peixe (cerca de 90%) e é anaeróbica e glicolítica, sendo utilizada para desempenhar breves eventos de nado de alta intensidade. Durante um nado em velocidade, a atividade de musculatura branca causa um acúmulo muscular de lactato, que necessita ser oxidado para que o peixe possa desempenhar um nado vigoroso novamente, desta forma, após tais eventos de exercício exaustivo, os peixes comumente exibem uma elevação no consumo de  $O_2$  (*Excess Post-exercise Oxygen Consumption-EPOC*) para promover a metabolização do lactato (FARRELL; GAMPERL; BIRTWELL, 1998; MCKENZIE, 2011).

A musculatura vermelha, por outro lado, está presente em menor quantidade (cerca de 10% da massa) sendo restrita a apenas duas faixas bilaterais adjacentes a espinha dorsal, e desempenha o metabolismo aeróbico, apresentando, portanto, mioglobina intracelular e uma grande quantidade de mitocôndrias (MAGNONI et al., 2013). Esta musculatura é empregada durante o nado prolongado e lento como, por exemplo, para forrageio, manter posição na correnteza ou durante longos períodos de migração (RODNICK; PLANAS, 2016). Para tanto, a musculatura vermelha necessita ser constantemente suprida tanto de substratos energéticos (carboidratos, lipídios e proteínas) quanto de  $O_2$  pela corrente sanguínea, sendo densamente irrigada por capilares sanguíneos e, portanto, muito dependente do débito cardíaco (MCKENZIE, 2011).

#### 1.4. Considerações sobre a espécie estudada

Matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829; Figura 3), é uma espécie de peixe teleósteo Neotropical que habita, no território brasileiro, rios da bacia amazônica central como rios Solimões, Madeira e Amazonas, se distribuindo também pelas bacias do rio Orinoco e Essequibo na Venezuela (DOS SANTOS FILHO; BATISTA, 2009; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003).

Segundo Britski (1972), o matrinxã ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTHYES

Subclasse: ACTINOPTERYGI

Superordem: OSTARIOPHYSI

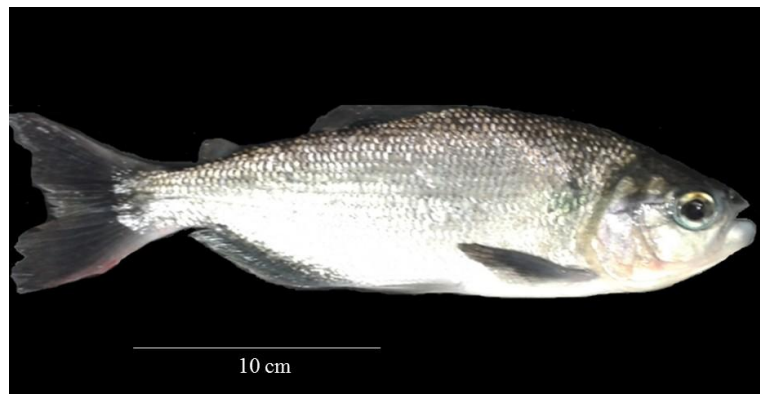
Ordem: CHARACIFORMES

Família: CHARACIDAE

Gênero: *Brycon*

Espécie: *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829)

Figura 3—Exemplar de matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829).



Fonte: RISSOLI (2018)

Durante a fase adulta, essa espécie desempenha hábito alimentar onívoro e ocupa ambientes lóticos como rios de corredeira, onde a velocidade média da água se mantém entre 1 e 2 m.s<sup>-1</sup> (ALMEIDA-VAL; GOMES; LOPES, 2005), e que apresentam temperaturas entre 24 e 32°C (GENSAC et al., 2016). Durante seu ciclo de vida, o matrinxã desempenha vários

eventos de migração trófica e também apresenta hábito reofílico, realizando migração durante o período reprodutivo (NAKAUTH et al., 2016).

Os eventos de migração trófica ocorrem quando os indivíduos se deslocam para as regiões de florestas alagadas durante as cheias, que se iniciam entre janeiro a abril, ou rio acima durante o período seco, entre agosto e setembro, processo de dispersão denominado popularmente de “arribação” (ZANIBONI FILHO, 1985). A migração reprodutiva, ou piracema, ocorre acompanhando o período das cheias entre dezembro e fevereiro e é realizada exclusivamente por indivíduos adultos (ZANIBONI FILHO, 1985). Durante as fases iniciais de desenvolvimento, essa espécie ocupa lagos e igarapés, onde as águas são mais limpas e oxigenadas, se deslocando durante a piracema pelos afluentes até o encontro dos rios Solimões e Negro para desova (ARAUJO-LIMA; RUFFINO, 2004), eventos nos quais seus cardumes podem percorrer distâncias superiores à 400 km contra a correnteza (MOUNIC-SILVA; LEITE, 2013).

Em adição ao seu hábito migratório, o matrinxã também apresenta naturalmente um elevado desempenho de nado (FABRIZZI et al., 2013; RIVAROLI; RANTIN; KALININ, 2006). Segundo FERREIRA et al. (2013), essa espécie pode atingir grandes velocidades de nado alcançando por volta de  $78 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , ou 6 comprimentos corpóreos por segundo ( $\text{CC}\cdot\text{s}^{-1}$ ), mesmo em condições de hipóxia. Ademais, estudos mostraram que indivíduos juvenis de matrinxã apresentam respostas positivas quando cultivados em níveis de exercício contínuo e prolongado ( $1,5\text{-}3,0 \text{ CC}\cdot\text{s}^{-1}$  - 30-72 dias), apresentando maiores taxas de crescimento corpóreo, ganho de massa e capacidade digestiva (ARBELÁEZ-ROJAS; INOUE; MORAES, 2011; FERREIRA et al., 2013; HACKBARTH; MORAES, 2006).

O matrinxã também apresenta adaptações metabólicas e hematológicas frente ao exercício em cativeiro. ARBELÁEZ-ROJAS & MORAES (2010) expuseram exemplares juvenis de matrinxã à diversas intensidades de exercício em cativeiro por 90 dias, constatando que as velocidades de nado de 13 e  $19,5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  ocasionaram incrementos no crescimento

corporal, hematócrito, depósito proteico na musculatura e estoque lipídico. Em conformidade, FABRIZZI et. al. (2013) submetendo esta espécie a um regime de exercício intermitente (12 h de exercício: 12h de descanso) à uma velocidade de  $13 \text{ cm}\cdot\text{seg}^{-1}$  por 30 dias, encontraram alterações no perfil sanguíneo (aumentos na concentração de hemoglobina nos eritrócitos) e metabólico (aumento de substratos de vias catabólicas aeróbicas).

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo principal a análise dos efeitos de regimes de exercício de diferentes níveis de intensidade sobre aparato contrátil ventricular de indivíduos adultos de matrinxã (*Brycon amazonicus*). Para tanto, pretendeu-se especificamente:

- a. Avaliar as possíveis alterações na taxa de crescimento corpóreo e na massa ventricular relativa apresentada pelos animais submetidos ao exercício;
- b. Verificar as possíveis alterações no desempenho cardíaco dos animais através da análise *in vitro* de parâmetros contráteis (força de contração, tempo para o pico de tensão, tempo para 50% do relaxamento, taxas de contração e relaxamento e capacidade de bombeamento cardíaco);
- c. Averiguar se existe um papel diferencial do retículo sarcoplasmático (RS), dos trocadores  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (NCX) e canais lentos de  $\text{Ca}^{2+}$  (LTCCs) durante a contração ventricular de animais controle e submetidos ao exercício;
- d. Analisar quantitativamente as proteínas que compõem canais e trocadores relacionados ao acoplamento E-C cardíaco (SERCA2, PLB, NCX e LTCCs) em animais controle e submetidos a diferentes regimes de exercício.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais desenvolvidos no presente trabalho foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Proc. 037/2013).

#### 3.1. Exposição dos animais aos regimes de exercício natatório sustentado

Indivíduos adultos de *Brycon amazonicus* com comprimento de aproximadamente 20 cm e peso de aproximadamente 200g foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais: grupo controle (CT, n = 16) e 4 grupos submetidos à diferentes intensidades de exercício (n = 16) por 60 dias. Uma vez que a espécie estudada apresenta reotaxia, quanto maior a velocidade da corrente de água, representada em centímetros por segundo ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ), em relação ao comprimento do peixe comumente, representada em comprimentos corpóreos por segundo ( $\text{CC}\cdot\text{s}^{-1}$ ) maior será a intensidade do exercício para os peixes. Os grupos exercitados foram divididos em velocidades onde os peixes foram capazes de vencer a corrente: exercício leve (EL,  $5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $0,2 \text{ CC}\cdot\text{s}^{-1} \pm 0,006$ ), exercício moderado (EM,  $10 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $0,4 \text{ CC}\cdot\text{s}^{-1} \pm 0,007$ ), exercício medianamente intenso (EMI,  $20 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $0,8 \text{ CC}\cdot\text{s}^{-1} \pm 0,008$ ) exercício intenso (EI,  $30 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $1,4 \text{ CC}\cdot\text{s}^{-1} \pm 0,02$ ). Do total de animais em cada grupo, 10 animais foram destinados aos experimentos *in vitro* e 6 animais à análise molecular. O exercício em peixes é realizado através da aplicação de uma corrente de água no sentido contrário ao sentido em que ocorre a natação do peixe, mimetizando uma condição presente em uma correnteza.

Os regimes de exercício foram realizados em tanques circulares com capacidade de 500L, dotado de renovação contínua de água, aeração constante, temperatura de  $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  (EL e EM) ou  $27 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  (EMI e EI) e sob regime natural de luminosidade (12:12). Foram construídos 2 tanques experimentais de exercício, um acoplado à uma motobomba Eletroplas modelo ICS-100AB de vazão máxima  $3,0 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$  para a realização dos grupos EL e EM e outro acoplado à uma motobomba Schneider modelo BCR 2000 de vazão máxima  $4,1 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$  para a

realização dos grupos EMI e EI. As saídas de água de cada uma das bombas foram conectadas a registros de água capazes de limitar a velocidade de ejeção, desta forma, possibilitou-se a delimitação das diferentes velocidades de corrente no interior do tanque. A representação de um modelo de tanque de exercício consta na Figura 4. Antes de ser introduzido no tanque de exercício, cada peixe foi anestesiado, sendo mergulhado em um balde de 10 L contendo uma solução de  $1 \text{ g.ml}^{-1}$  de benzocaína em água, para o procedimento de biometria. Após a biometria os peixes foram imediatamente introduzidos nos tanques de exercício.

Figura 4- A- Tanques de 500 L acoplados à motobombas utilizados na realização dos diferentes protocolos de exercício. B- Detalhe da corrente circular de água gerada pela motobomba, as setas vermelhas indicam o sentido da corrente.



Fonte: RISSOLI (2018)

Os peixes do grupo EI foram submetidos a uma corrente d'água com velocidade de  $30 \text{ cm.s}^{-1}$ , velocidade mais alta atingida pela bomba utilizada no presente trabalho. Os peixes do grupo EMI foram submetidos à velocidade de  $20 \text{ cm.s}^{-1}$ , os do grupo EM à velocidade de  $10 \text{ cm.s}^{-1}$  e os do grupo EL à velocidade de  $5 \text{ cm.s}^{-1}$ . A escolha de quatro regimes de velocidade da água foi realizada com base no trabalho de CASTRO *et al.* (2013), que verificaram respostas diretamente proporcionais à intensidade dessas corrente em *Salmo salar*.

Todos os grupos experimentais (EI, EMI, EM e EL) permaneceram sob seus respectivos tratamentos ininterruptamente por 60 dias, um período comparável aos períodos de migração desempenhados pela espécie estudada (ZANIBONI FILHO, 1985). Tal período de exercício ininterrupto foi estabelecido com base nos experimentos de OBA (2006), que demonstrou que



indivíduos desta espécie suportam regimes prolongados de exercício ( $60 \text{ dias a } 20 \text{ cm.s}^{-1}$ ) sem qualquer tipo de prejuízo. Além disso, HACKBARTH (2004) submeteu exemplares jovens de matrinxã a exercício contínuo ( $42 \text{ cm.s}^{-1}$ ) por 37 e 72 dias e verificou melhoria na taxa de conversão alimentar aparente e no crescimento dos indivíduos, principalmente após 72 dias de exercício.

Os animais do grupo CT permaneceram em tanques com água estática (ou seja, sem uma corrente contrária) por 60 dias. Grupos CT distintos foram realizados para cada grupo experimental. Os CT dos grupos EL e EM foram mantidos na temperatura de  $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  enquanto que os CT dos grupos EMI e EI foram mantidos à  $27 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ , em virtude do aumento de temperatura da água imposto pela motobomba de maior potência. Cabe ressaltar que tais animais não podem ser considerados completamente sedentários visto que apresentam o hábito de natação constante quando em conjunto. A análise de um grupo CT, não submetido a qualquer intensidade de corrente, se faz necessária para a comparação dos resultados obtidos após 60 dias de nado espontâneo (condição similar àquela de cativeiro) com os obtidos para os demais grupos experimentais. Salienta-se que não é possível manter exemplares de matrinxã em sedentarismo, condição que exigiria o confinamento em um tubo de contenção, situação que os levaria à morte por estresse em poucos dias (observações do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da UFSCar). Os peixes de todos os grupos experimentais foram alimentados diariamente, *ad libitum*, com ração comercial para peixes (de 6-8 mm com 36% de proteína), durante todo o período do experimento.

Ao final do período de exercício, os peixes de cada grupo experimental foram eutanasiados por meio de secção medular por transecção da coluna espinal, em conformidade com as normas de eutanásia da “American Veterinary Medical Association” (AVMA, 2001) e em conformidade com a Lei Nº 11.794, de 8/10/2008 da Constituição Federal, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. De acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a Resolução nº 714 de 20/06/2002 do

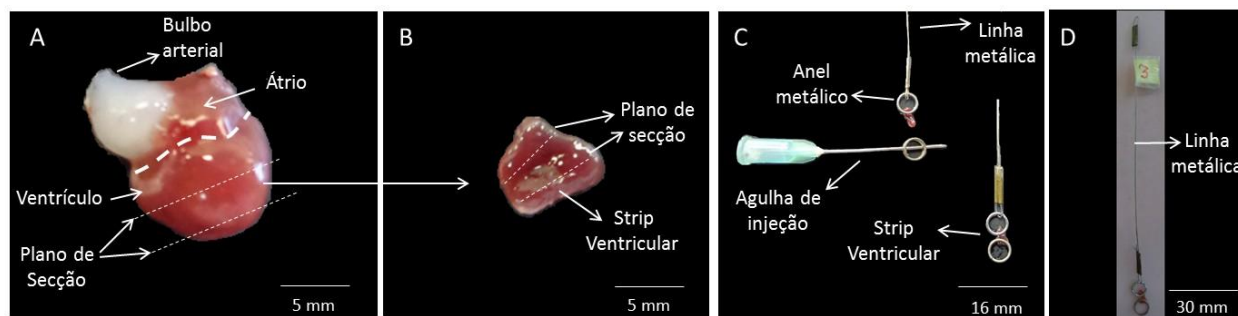
Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), tal método de eutanásia é aceito sob restrição e deve ser empregado somente diante da total impossibilidade do uso de anestésicos. Entretanto, qualquer anestésico empregado na eutanásia interfere no funcionamento cardíaco, podendo induzir o inotropismo negativo pela inibição dos LTCCs, da atividade da PMCA e da SERCA2 ou pelo bloqueio das junções gap, o que pode gerar um desacoplamento elétrico dos miócitos e reduzir a sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  e o número de pontes cruzadas (DAVIES et al., 2000; HANLEY; TER KEURS; CANNELL, 2004).

Imediatamente após a eutanásia, os peixes foram novamente medidos e pesados e tiveram seus corações retirados para a realização das análises *in vitro* e coleta de tecidos para a posterior análise molecular (que foram estocados em freezer à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises).

### **3.2. Análise da função cardíaca *in vitro***

As preparações experimentais foram efetuadas de acordo com os procedimentos adotados por RISSOLI et al., (2017). Após a eutanásia, cada coração foi removido cirurgicamente e imerso em solução fisiológica própria para matrinxã. O grupo EL bem como seu grupo CT foram realizados em uma solução contendo 125,0 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 0,94 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1,0 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 30,0 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM de HEPES, 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$  e 10 mM de glicose; os grupos EM, EMI e EI, bem como seus respectivos grupos CT, foram realizados em uma solução idêntica à descrita mas com 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ . As soluções fisiológicas foram aeradas e tamponadas com uma mistura carbogênica (2%  $\text{CO}_2$  e 98%  $\text{O}_2$ ) por aproximadamente 5 minutos. Após o aborbulhamento, o pH final das soluções foram ajustados para pH 7,4. Em seguida, como representado na Figura 5, foram preparadas tiras ventriculares de largura de aproximadamente 1-2 mm através do corte transversal do ventrículo. O ápice do ventrículo foi descartado para diminuir a probabilidade de ocorrência de contrações espontâneas das preparações no decorrer dos experimentos e a porção de musculatura compacta foi descartada.

Figura 5- A- Foto do coração de *B. amazonicus* com indicações da posição do átrio, bulbo arterial, ventrículo e o plano de secção do qual foram extraídas as fatias ventriculares. B- Fatia ventricular com indicação do plano de secção dos strips ventriculares, C- strip ventricular fixado entre dois anéis metálicos, um livre e outro preso a uma linha metálica, D- visão geral do strip ventricular fixado entre os anéis.



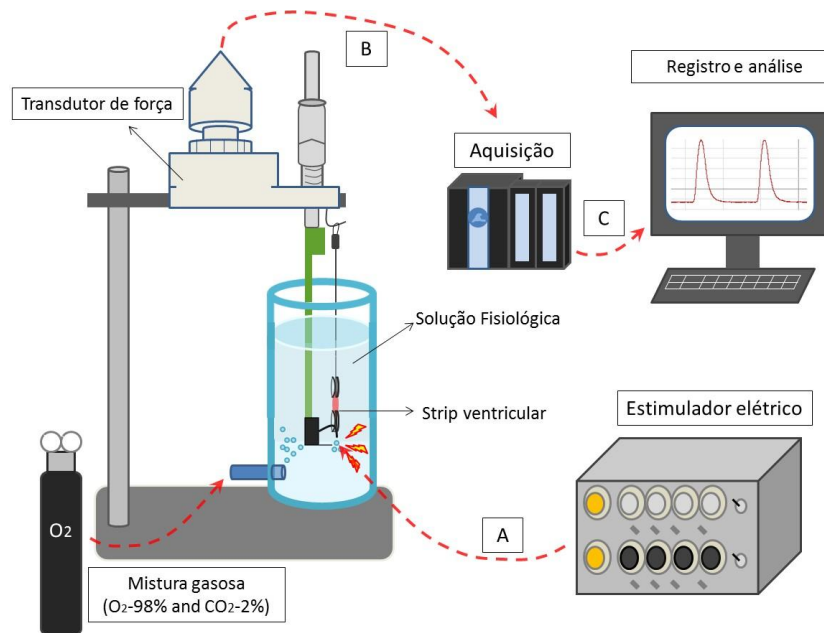
Fonte: RISSOLI (2018)

A representação esquemática do sistema de aquisição de dados consta na Figura 6. As extremidades das tiras foram presas a duas pequenas espirais metálicas e transferidas para um banho contendo 25 mL da solução fisiológica, descrita anteriormente, termostatzada a 25 °C (para os grupos EL e EM) ou 27°C (para os grupos EMI e EI), e dotada de borbulhamento constante de mistura carbogênica composta de 2% CO<sub>2</sub> e 98% O<sub>2</sub>. Uma extremidade da tira foi fixada à parte terminal de um eletrodo de estimulação. A outra extremidade foi conectada a um transdutor de força isométrica.

Os eletrodos de estimulação foram acoplados a um estimulador (Grass S88 Stimulator, West Warwick, RI, USA), permitindo a estimulação elétrica das tiras para o desenvolvimento da tensão isométrica (Fc) em diferentes frequências de estimulação. Os transdutores de força isométrica (Grass FT.03 Transducer, Grass Technologies, West Warwick, RI, USA) foram acoplados ao sistema de aquisição de dados Biopac MP150 (Biopac Systems, Inc., USA) com software de análise AcqKnowledge (Biopac Systems Inc., USA). As tiras foram estimuladas a uma frequência constante de 0,2 Hz durante o período de estabilização de 40 minutos e, em seguida, foram realizados os seguintes protocolos experimentais:

- a. Efeito do tempo experimental: para avaliar a possível ocorrência de deterioração da Fc no decorrer do período experimental. As preparações foram estimuladas a 0,2 Hz durante 40, durante o qual a Fc foi registrada ininterruptamente.

Figura 6- Diagrama representando um *strip* ventricular imerso em solução fisiológica e acoplado ao transdutor de força. **A**- estimulação elétrica capaz de desencadear uma contração, **B**- a tensão gerada pela contração é convertida em um sinal elétrico pelo transdutor de força e transmitido para o sistema de aquisição, **C**- o registro é gravado e analisado.



Fonte: RISSOLI (2018)

- b. Relação força-frequência: capacidade do miocárdio em manter o acoplamento E-C em diferentes frequências, avaliada por meio de incrementos progressivos na frequência de estimulação, a partir de 0,2 Hz, até que os registros se tornem irregulares.
- c. Contração pós-pausa (PRC): tiras estimuladas a 0,2Hz são submetidas a pausas na estimulação elétrica de 30s, período que desencadeou melhores resultados em experimentos piloto. A primeira contração após a pausa é analisada a fim de se avaliar capacidade de armazenamento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- d. Importância funcional do RS na contratilidade miocárdica: os protocolos descritos foram repetidos na presença de rianodina, adicionada ao banho na concentração de 10  $\mu\text{M}$ . A rianodina, um alcaloide de origem vegetal, se liga irreversivelmente aos canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, inibindo sua função. Tal protocolo foi realizado para todos os grupos.
- e. Importância funcional do NCX na contratilidade miocárdica: os protocolos acima descritos (itens a, b, c) foram realizados em solução fisiológica contendo LiCl em substituição ao NaCl (125,0 mM de LiCl, 2,5 mM de KCl, 0,94 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1,0 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 30,0

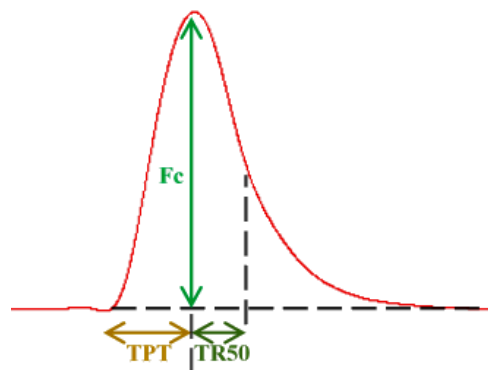
mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM de glicose), o que promove o bloqueio total do NCX. Tal protocolo foi realizado nos grupos EL e EM.

- f. Importância do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via NCX: os protocolos descritos foram repeditos na presença de 10  $\mu\text{M}$  do antagonista seletivo KB-R7943 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), capaz de bloquear o modo reverso do NCX. Tal protocolo foi realizado nos grupos EMI e EI.
- g. Importância do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via LTCCs: os protocolos descritos foram repeditos na presença de 10  $\mu\text{M}$  do antagonista seletivo Verapamil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), capaz de bloquear os LTCCs. Tal protocolo foi realizado nos grupos EMI e EI.

A Fc de cada tira ventricular foi calculada pela diferença entre os valores do pico da tensão isométrica e expressa em valores absolutos ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) e o produto da Fc pela frequência de estimulação foi usado para determinar o índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC). Os parâmetros tempo-dependentes foram analisados em todos os protocolos e expressos em valores absolutos (ms) como TPT (“*time to peak tension*” – tempo para o pico de tensão), TR50 (tempo para 50% de relaxamento).

A representação gráfica dos parâmetros analisados nos protocolos de função cardíaca *in vitro* está representada na Figura 7.

Figura 7- Exemplo de um registro de contração isométrica. Fc: Pico de tensão isométrica; TPT: tempo para o pico de tensão; TR50: tempo necessário para que ocorra 50% do relaxamento.



### **3.3. Western blotting**

#### **3.3.1. Homogeneização do músculo cardíaco**

Porções de tecido ventricular de matrizã de todos os grupos experimentais (CT, EI, EMI, EM e EL, n=6) congelados à -80 °C, e de rato *Wistar* (utilizado como referência) foram homogeneizados em 500 mg de tecido em 500 µL de tampão hiperosmótico (Sacarose 250 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM pH 7,4). O homogenato foi obtido utilizando-se de um homogeneizador (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX®), que provoca a ruptura de tecidos por corte com lâminas e cavitação. Os homogenatos foram vertidos em microtubos e passaram por um processo de centrifugação a uma força de 10.000 G pelo período de 40 min a uma temperatura de 4°C. Em seguida, apenas o sobrenadante foi colhido, sendo descartado o pellet. O sobrenadante colhido foi então submetido à ultracentrifugação, 100.000 G a 4 °C por 60min. Após este processo, o sobrenadante remanescente foi descartado e o pellet, a porção de maior densidade que se aderiu no fundo do tubo após a ultracentrifugação, foi solubilizado em tampão Tris-EDTA (Tris 50 mM; EDTA 1 mM; pH 7,4). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

#### **3.3.2. Quantificação de proteínas e preparação das amostras para eletroforese.**

A quantificação de proteínas foi realizada através do método de Bradford com espectrofotômetro a 595 nm. Cada amostra foi diluída em tampão Tris-EDTA na proporção de 1:30 (1 µL amostra e 29 µL tampão Tris-EDTA). Foram utilizados 10 µL da amostra diluída em cada poço da microplaca e, em seguida, foi acrescentado na placa 200 µL de reagente Bradford.

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando-se uma microplaca em uma escala gradual de concentrações de proteína para construção de uma curva padrão, utilizada como referência para a quantificação das amostras. Para construção desta curva utilizou-se uma solução de albumina do soro bovino (BSA - Bovine Serum Albumin) na concentração conhecida de 1mg.mL<sup>-1</sup>. A BSA foi adicionada em quantidades crescentes nos poços da

miroplaca (0, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{L}$ ), que, em seguida, foram completados até 10  $\mu\text{L}$  com tampão Tris-EDTA. A cada poço foi acrescentado 200  $\mu\text{L}$  de Bradford, que reage com as proteínas provocando uma alteração na coloração proporcional a concentração proteica de solução. Após a reação, onde a placa foi mantida no escuro por 10 minutos, efetuou-se determinação absorvância de cada poço da placa de Elisa em espectrofotômetro. A partir de tais resultados, foi realizada uma curva de calibração que possibilitou a determinação das concentrações proteicas das amostras de tecido ventricular homogeneizado de rato Wistar e de matrinxã em diferentes protocolos de exercício.

Com base na concentração das amostras, calculou-se o volume necessário para a 100  $\mu\text{g}$  de proteína de cada grupo. Tal volume foi pipetado em eppendorf e misturado com igual volume de tampão de Laemmli (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad Laboratories, # 1610737), cada solução foi, então, aquecida em dry bath (100  $^{\circ}\text{C}$  por 5 min) e, em seguida, centrifugada a 11000 rpm por 5 min (Microcentrifuge Eppendorf, 5424).

### **3.3.3. Expressão proteica da SERCA2, PLB, NCX e LTCCs.**

A solução resultante de cada grupo, contendo 100  $\mu\text{g}$  das amostras e o tampão Laemmli, foi pipetada nos poços do gel de poliacrilamida para eletroforese (10% SDS-PAGE). Em cada gel destinou-se uma banda para a amostra de rato Wistar, 3 bandas para o grupo CT (matrinxã pertencente ao grupo controle) e 3 bandas para os diferentes grupos de exercício, cada gel foi realizado em duplicata. A um dos poços foi adicionado o marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Prestained Standards, Dual Color – Bio-Rad Laboratories), que gera bandas coloridas de diferentes pesos moleculares (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 e 250 kDa) para referência. Após as amostras serem pipetadas, o gel foi imerso em tampão de corrida (25 mM Tris, 190mM Glicina, 10% SDS) e aplicou-se, então, o processo de eletroforese a 100 V por 2 h.

Anteriormente ao término da eletroforese, membranas de fluoreto de polividileno (PVDF) foram cortadas em formato retangular (10 cm x 7 cm) de tratadas em metanol por 20

segundos e, em seguida, lavadas com água destilada, sendo, então, mantidas em tampão de transferência (25mM Tris; 190 mM Glicina; Metanol 20%; SDS 0,05%; água destilada q.s.p. 1L) por mais 20 minutos. Após o término eletroforese, o gel foi acondicionado em contato com uma membrana de PVDF (10 cm x 7 cm) e o conjunto foi posicionado entre duas lâminas também retangulares de papel Whatman de dimensões iguais a da membrana. O conjunto foi posicionado entre duas esponjas e unido por meio de uma moldura plástica que, por sua vez, foi encaixada no aparato de transferência e imersa em tampão transferência no interior de uma cuba de eletroforese. O processo de transferência foi realizado a 100 V por 2 h a 4 °C. Ao final, todo o conteúdo proteico do gel foi transferido para membrana de PVDF.

Em seguida, cada membrana foi retirada do conjunto de transferência e imersa em com solução bloqueadora (10 mM Tris, 100 mM de NaCl, Tween-20 a 0,1%, pH 7,4 com 5% de leite desnatado em pó) por 90 min sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com os respectivos anticorpos primários específicos para a análise de cada componente. Para a análise do NCX foi utilizado o anticorpo policlonal de coelho anti-NCX1 (0,5 µg/ml, NCX anticorpo: SC-32881, Santa Cruz Biotechnology, EUA), para a SERCA2 anticorpo de coelho anti-SERCA2 (0,1 µg/ml SERCA2 policlonais ug / ml, SERCA2: AB91032, Abcam, UK, AB91032), para PLB anticorpo de camundongo anti-PLB monoclonal (0,15 ug/ml, o anti-fosfolambano # 05-205, Upstate Chemicon, EUA), para LTCCs anticorpo monoclonal de camundongo anti L-Type Ca<sup>2+</sup> CP α1C (0,5 ug.mL<sup>-1</sup>, sc-398433, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) e camundongo anti-GAPDH (0,1 µg/ml GAPDH [6C5] ab8245, Abcam,UK).

Em seguida, as membranas foram lavadas novamente em tampão (10 mM Tris, 100 mM de NaCl, Tween-20 a 0,1%, pH 7,4) por 30 min, cada membrana foi incubada durante 2 horas com os anticorpos conjugados com fosfatase alcalina IgG anti-coelho para o NCX (0,2 mg/mL, sc-2034, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-IgG de camundongo para a SERCA2 e LTCCs (0,2 mg/mL, sc-2355, Santa Cruz Biotechnology, EUA), para o PLB (0,33 mg/mL, AP308A,



Upstate Chemicon , EUA) e anti-IgG de coelho para o GAPDH (0,2 mg/mL, sc-2034, Santa Cruz Biotechnology, EUA). Em seguida, a membrana foi novamente lavada com tampão (10 mM Tris, 100 mM de NaCl, Tween-20 a 0,1%, pH 7,4) por 30 min e os imunocomplexos foram detectados utilizando um kit de revelação específico para a fosfatase alcalina (Bio-Rad, CA, EUA).

Após a secagem das membranas por 12 h as bandas marcadas foram fotografadas digitalmente em transiluminador de luz branca (CSL-UVTS, Cleaver Scientific LTD) e a densidade das bandas presentes nos registros digitais foi calculada utilizando-se o software ImageJ. Em cada grupo experimental, os valores obtidos para cada componente (NCX, SERCA2, LTCCs e PLB) foram normalizados em função dos seus respectivos valores de GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), resultando em valores quantitativos expressos em unidades arbitrárias (U.A.).

### **3.4. Forma de Análise dos Resultados**

Os dados obtidos para cada grupo experimental (n = 16) foram expressos em média  $\pm$  1 erro padrão da média (E.P.M.) e foram representados da seguinte forma:

- A massa corpórea (Wb) foi expressa em gramas (g);
- O comprimento do corpo (Lb): foi expresso em centímetro (cm);
- Massa Ventricular Relativa (RVM): foi expressa como uma porcentagem da massa corpórea (MVR - % of Wb);
- Força de Contração (Fc): foi expressa em  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ;
- Capacidade de Bombeamento Cardíaco (CBC): foi expressa em  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ;
- Parâmetros Tempo-Dependentes:
  - Tempo de Contração ou Tempo para o Pico de Tensão (TPT - time to peak tension): representado em ms;
  - Tempo para 50% do Relaxamento (TR50%): representado em segundos.

- Efeito da pausa prolongada na estimulação sobre a geração de força.
- A razão entre os valores dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e TR50%) sobre os valores de Fc serão expressos em s/ mN.mm<sup>2</sup>.
- Os blots de proteína foram fotografados e analisados com o auxílio do software ImageJ (ABRAMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004), em unidades arbitrárias de densidade óptica (U.A.) para posterior comparação.

### 3.5. Procedimentos Estatísticos

Os dados foram apresentados como médias  $\pm$  EPM.

Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov e Smirnov. As diferenças entre os grupos foram analisadas por teste-t não pareado. Para comparar os efeitos da frequência de estimulação em cada grupo utilizou-se one-way ANOVA seguido por teste post-hoc Tukey-Kramer.

As diferenças que apresentaram valores de  $P < 0,05$  foram consideradas significantes. Os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad InStat 3.00 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Grupo de exercício leve (EL)

#### 4.1.1. Resultados

##### 4.1.1.1. Características biométricas

Os valores absolutos de massa ( $W_b$  – g) e comprimento ( $L_b$  – cm) corporais dos grupos experimentais CT e EL, antes e depois dos 60 dias experimentais, são apresentados na Tabela 1. Esta tabela também apresenta os valores de  $W_b$  e  $L_b$  de ambos os grupos após 60 dias experimentais, expressos como % dos valores iniciais. A normalização de  $W_b$  e  $L_b$  (% valores iniciais) mostrou não haver diferença significativa entre os valores do grupo CT antes e depois de 60 dias. Entretanto, para o grupo EL, os aumentos em  $W_b$  e  $L_b$  foram extremamente significativos (Mann-Whitney,  $p < 0,0001$ ). Os valores de MVR apresentados pelos grupos EL e CT não apresentaram diferença significativa.

Tabela 1-Tabela 1. Valores de massa ( $W_b$ ) e comprimento ( $L_b$ ) corpóreos e de massa ventricular relativa (MVR) dos grupos experimentais CT e EL, antes e depois dos 60 dias experimentais.

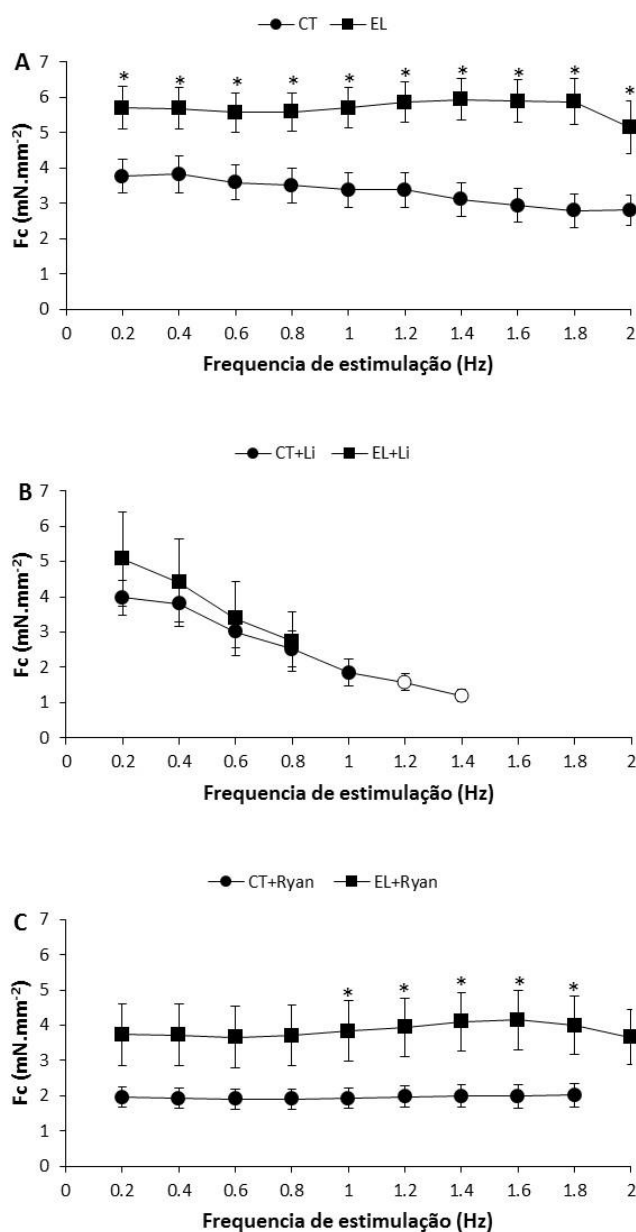
Parâmetro	Grupo CT		Grupo EL	
	Inicial	Após 60 dias	Inicial	Após 60 dias
<b>Wb (g)</b>	261,0 ± 24,6	264,2 ± 25,1	187,1 ± 25,7	250,5 ± 25,4
<b>Wb (%)</b>	2,6 ± 0,7		40,4 ± 5,8	
<b>Lb (cm)</b>	25,1 ± 1,5	25,3 ± 1,0	22,5 ± 0,1	25,3 ± 0,6
<b>Lb (%)</b>	1,7 ± 1,7		13,4 ± 1,3	
<b>MVR (%)</b>	0,073 ± 0,003		0,080 ± 0,002	

##### 4.1.1.2. Efeito da frequência de estimulação sobre os parâmetros contráteis.

Os valores de  $F_c$  apresentados pelo grupo EL foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos do grupo CT em toda a faixa de frequências de estimulação (de 0,2 a 2,0Hz) (Figura 8A). A comparação entre os grupos EL+Li e CT+Li não revelou diferença significativa entre os valores de  $F_c$  na faixa de frequência suportada pelas tiras do grupo EL+Li, onde a frequência máxima suportada pelas tiras desse grupo foi de 0,8Hz, enquanto a frequência máxima suportada pelas preparações

ventriculares do grupo CT+Li foi 1,4Hz (Figura 8B). As tiras ventriculares do grupo EL+Ryan foram capazes de contrair regularmente até 2,0Hz e as do grupo CT+Ryan até a frequência de 1,8Hz. A comparação entre os grupos mostrou que os valores apresentados por EL+Ryan foram superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos de CT+Ryan entre as frequências de 1,0 e 1,8Hz (Figura 8C).

Figura 8- Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de força de contração ( $F_c$ -mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício leve (EL, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Pannel A- comparação entre os grupos em condição padrão. Pannel B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Pannel C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*). Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental.



A comparação dos valores de CBC entre os grupos EL e CT revelou os valores apresentados pelo grupo EL foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos de CT nas frequências de 0,2 e 2,0Hz, todas as frequências analisadas (Figura 9A). A comparação entre os grupos EL+Li e CT+Li não mostrou diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos (Figura 9B). Entre os grupos EL+Ryan e CT+Ryan, os valores de EL+Ryan foram superiores aos de CT+Ryan nas frequências entre 1,0 e 1,8Hz, frequência máxima suportada pelo grupo CT+Ri (Figura 9C).

A Figura 10 mostra os valores (média  $\pm$  EPM) da tensão de contração ( $F_c$ -mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos CT e EL em comparação com os efeitos do lítio (grupo+Li) e rianodina (grupo+Ryan) obtidos para cada grupo. No grupo CT a inibição funcional do NCX promoveu reduções significativas ( $P < 0,05$ ) na  $F_c$  entre as frequências de 1,0 Hz (45%) e 1,4Hz (61%) enquanto que a inibição funcional do RS acarretou em reduções nos valores de  $F_c$  entre 0,2Hz (91%) e 0,6 Hz (88%) (Figura 10A). No grupo EL, entretanto, a inibição do NCX ocasionou reduções significativas ( $P < 0,05$ ) entre 0,6Hz (39%) e 0,8Hz (51%) e a inibição do RS promoveu reduções (52-45%) significativas ( $P < 0,05$ ) entre 0,2 e 1,8Hz (Figura 10B).

Figura 9- Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC-mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício leve (EL, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*). Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental.

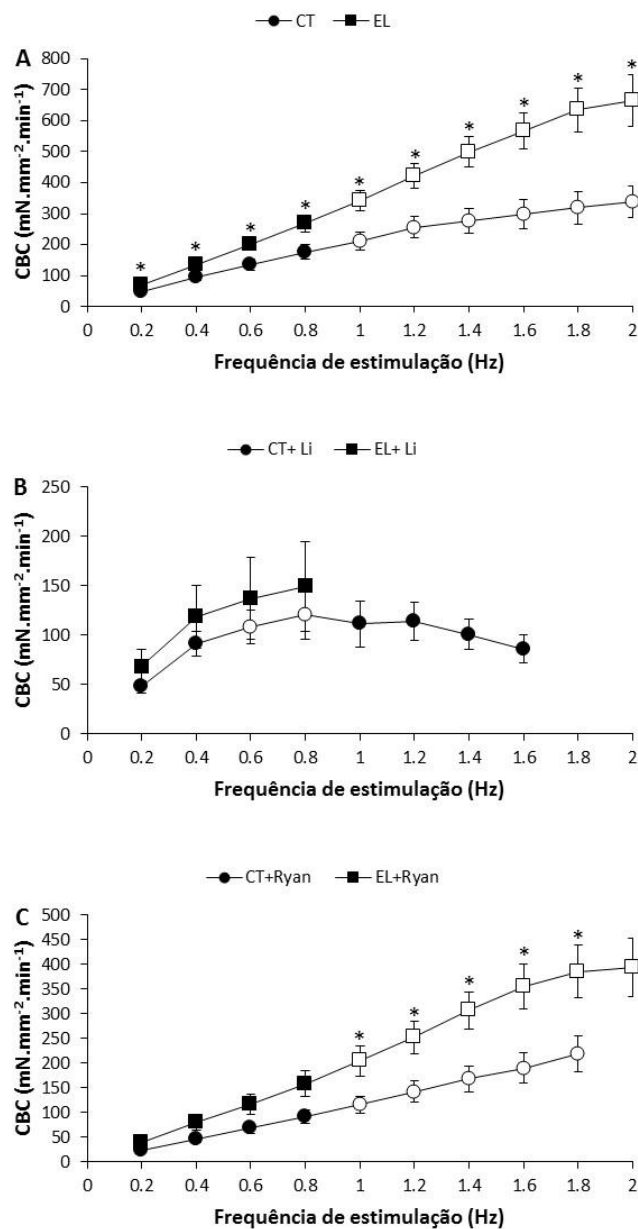
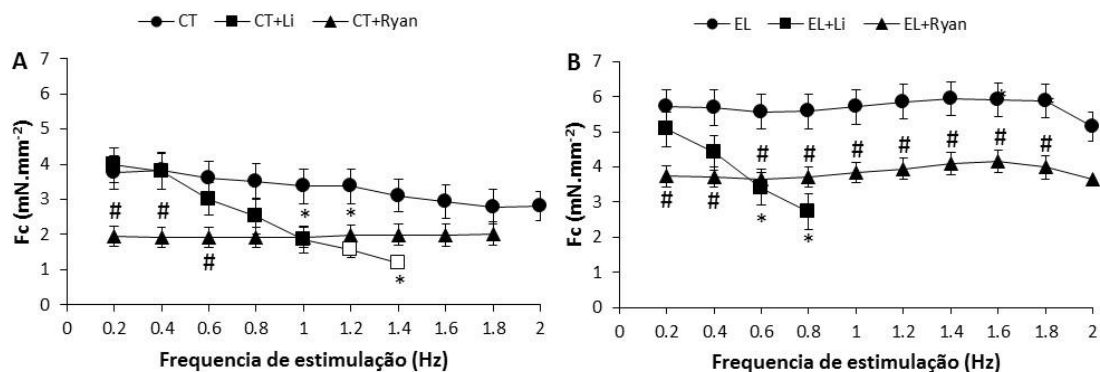


Figura 10- Valores (média  $\pm$  E.P.M) de força de contração ( $F_c$ -mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) e Exercício leve (EL, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Pannel A- comparação entre os valores apresentados pelo grupo controle (CT, n=10) em condições padrão e após o tratamento com Lítio (CT+Li) e 10  $\mu$ M de Rianodina (CT+Ryan). Pannel B- comparação entre os valores apresentados pelo grupo Exercício leve em condições padrão (EM, n=10) e após o tratamento com Lítio (EM+Li) e 10  $\mu$ M de Rianodina (EM+Ryan). (\*) indica diferença entre os grupos em condição padrão e grupo+Li, (#) diferença entre grupo padrão e grupo+Ryan.



Na Figura 11 consta a representação gráfica dos valores (média  $\pm$  E.P.M) de  $R_{TPT}$  ( $F_c \cdot TPT^{-1}$ -mN.mm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) sob aumentos graduais na frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Os valores apresentados pelo grupo EL foram de 43% (0,2Hz) à 92% (2,0Hz) superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos do grupo CT em todas as frequências de estimulação analisadas (Figura 11A). Os valores de  $R_{TPT}$  não diferiram entre os grupos EL+Li e CT+Li em nenhuma das frequências analisadas (Figura 11B). Ademais, os valores apresentados por EL+Ryan foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos de CT+Ryan apenas nas frequências de 1,4 e 1,6Hz (Figura 11B).

Na Figura 12 consta a representação gráfica dos valores (média  $\pm$  E.P.M) de  $R_{TR50}$  ( $F_c \cdot TR50^{-1}$ -mN.mm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) sob aumentos graduais na frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Os valores apresentados pelo grupo EL foram de 75% (0,2Hz) à 103% (2,0Hz) superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos do grupo CT em todas as frequências de estimulação analisadas (Figura 12A). Os valores de  $R_{TR50}$  também não diferiram entre os grupos EL+Li e CT+Li em nenhuma das frequências analisadas (Figura 12B). Os valores de  $R_{TR50}$  apresentados pelos grupos EL+Ryan e CT+Ryan não apresentaram diferença estatística (Figura 12C).

Figura 11- Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) da taxa para pico de tensão ( $R_{TPT}$ -mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício leve (EL, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painel A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painel B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painel C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*).

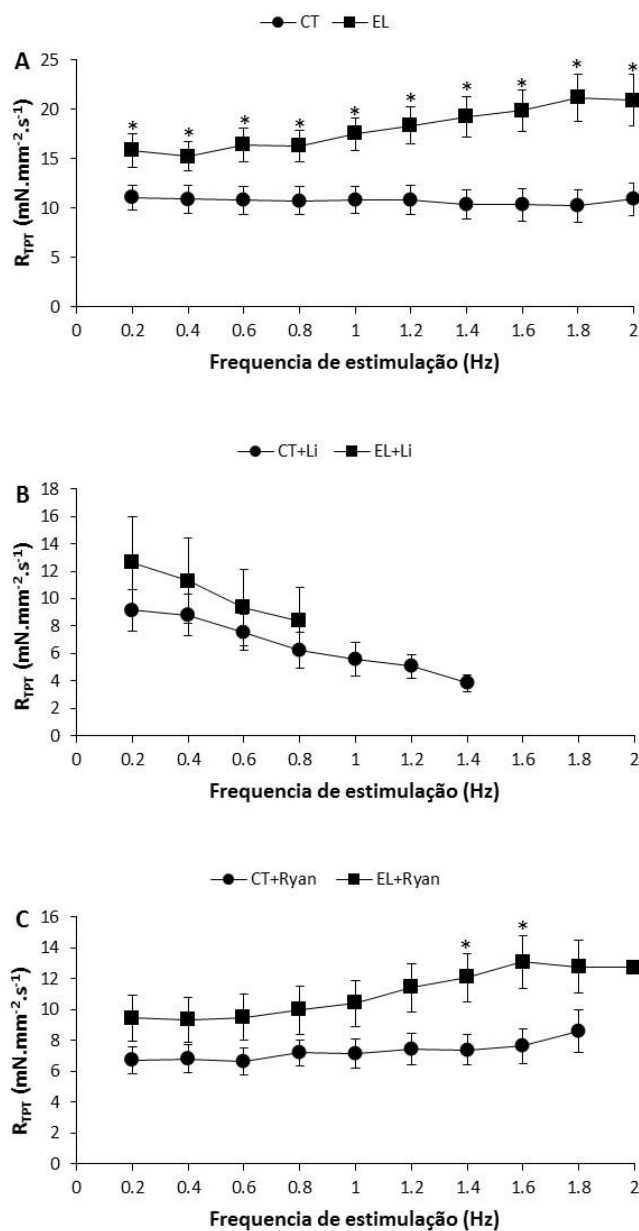
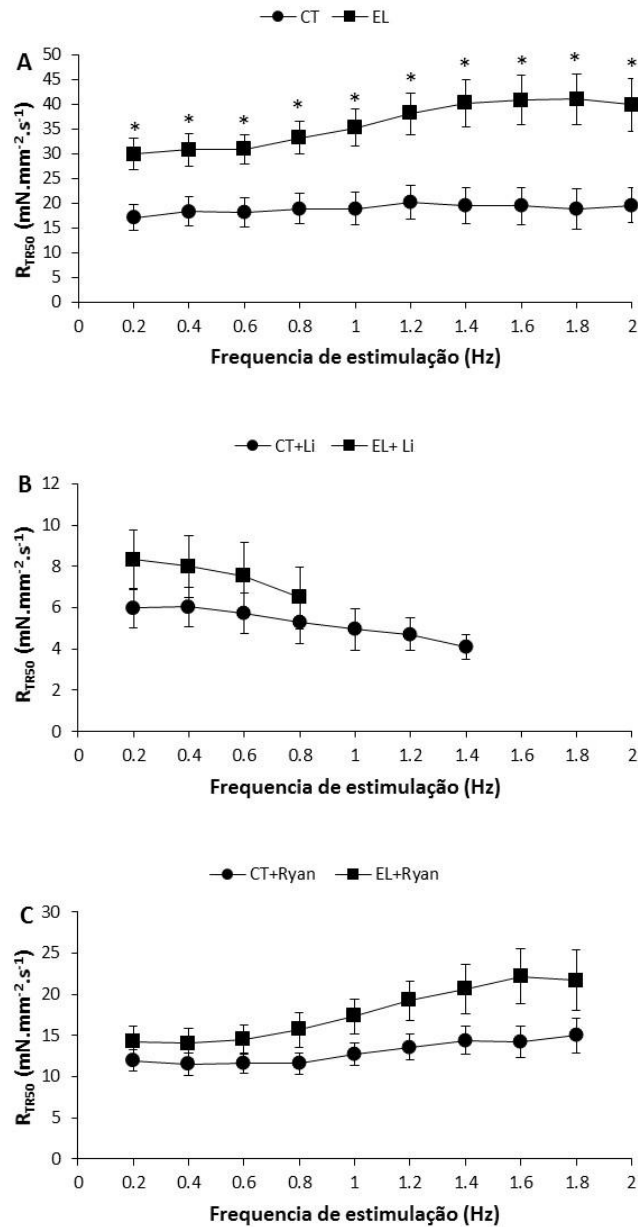




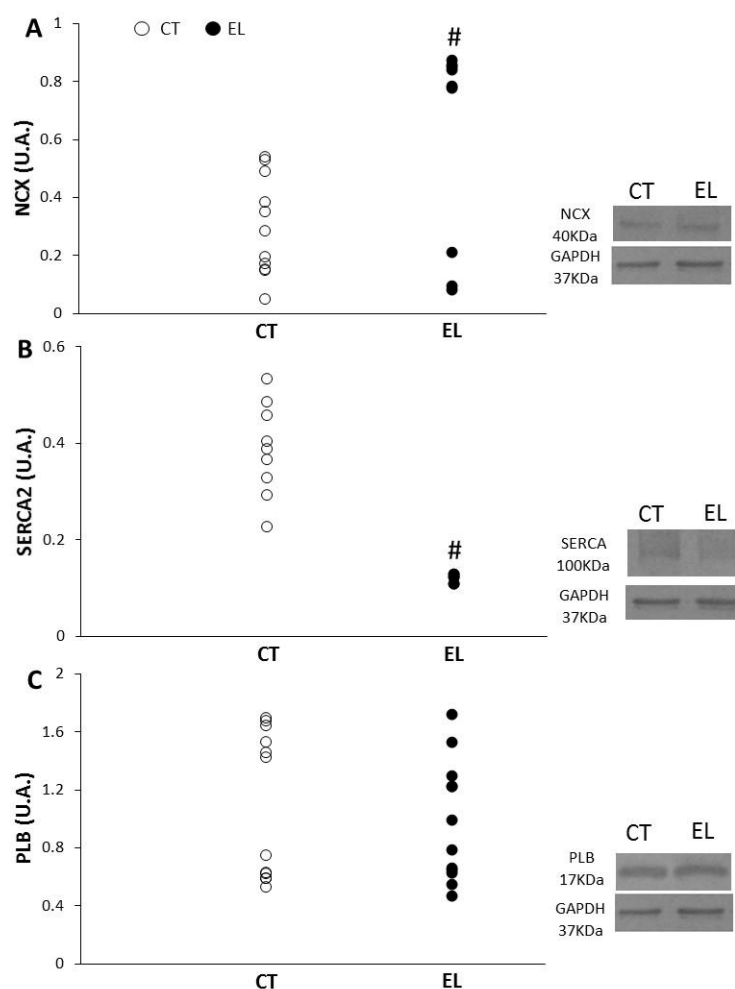
Figura 12- Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) da taxa para 50% de relaxamento ( $R_{TR50}$ -mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício leve (EL, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*).



#### 4.1.1.3. Análise proteica por Western Blotting

A comparação entre os níveis expressão das proteínas manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  NCX, SERCA2 e PLB encontradas na musculatura ventricular em indivíduos de *B. amazonicus* dos grupos EL e CT são apresentados na Figura 13, a expressão de cada banda está representada em pontos univariados. Os níveis de GAPDH não variaram entre os grupos. EL apresentou maiores níveis ( $P < 0,05$ ) de NCX (+15%) em comparação ao grupo CT (Figura 13A). Os níveis de SERCA2 foram 65% inferiores em EL em comparação ao grupo CT ( $P < 0,01$ ) (Figura 13B). Os níveis de PLB não diferiram entre os grupos (Figura 13C).

Figura 13- Comparação entre os valores médios das taxas de expressão do NCX, PLB e SERCA2 de tecido ventricular de *B. amazonicus* (n=6) dos grupos CT e EL. Valores são apresentados em unidades arbitrárias (U.A.  $\pm$  E.P.M) calculadas a partir da normalização das densidades ópticas obtidas para as proteínas analisadas em função dos valores de densidade de GAPDH das respectivas amostras. A- comparação entre as taxas de expressão do NCX. B- comparação entre as taxas de expressão do SERCA2. C- comparação entre as taxas de expressão da PLB. (#) indica diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os diferentes grupos.



#### 4.1.2. Discussão

Os animais EL apresentaram taxas de ganho de massa e de crescimento corpóreo superiores em relação aos CT, corroborando os diversos trabalhos que descreveram efeitos positivos no crescimento e ganho de massa de matrinxã em resposta ao exercício contínuo (ARBELÁEZ-ROJAS; INOUE; MORAES, 2011; ARBELÁEZ-ROJAS; MORAES, 2010; HACKBARTH; MORAES, 2006). Os valores de MVR do grupo EL não variaram significativamente em relação aos do seu respectivo grupo CT (EL-  $0,080 \pm 0,002\%$  e CT-  $0,073 \pm 0,003\%$ ). Em conformidade, diversos estudos também não relataram aumentos na MVR em espécies de peixe expostas a períodos prolongados de exercício de baixa intensidade (DINDIA; ALDERMAN; GILLIS, 2017; WALKER; EMERSON, 1978; FARRELL et al., 1990). Entretanto, apesar da manutenção dos valores de MVR, o protocolo de exercício leve induziu elevações marcantes no processo contrátil ventricular de *B. amazonicus*. Tais resultados podem indicar que o incremento no desempenho cardíaco do grupo EL deveu-se a um aumento na expressão e/ou atividade dos canais e trocadores responsáveis pelo manejo  $Ca^{+2}$  durante o processo contrátil (LTCCs, NCX, RyR e SERCA2) e não a um aumento no número de fibras contráteis na musculatura ventricular.

Indícios de um incremento no acoplamento E-C cardíaco frente a um regime de exercício intenso (exposição contínua à de velocidade de 20 cm/s por 10 semanas) foram descritos por CASTRO et. al. (2013) para o salmão do Atlântico, *S. salar*. Tais autores observaram o aumento na expressão de genes que codificam subunidades de LTCCs, bem como de uma proteína que regula a função dos canais de RyR, a FK-506. Entretanto, trabalhos enfocando o efeito do exercício sobre a expressão de genes bem como estudos funcionais avaliando o papel relativo dos componentes ligados ao acoplamento E-C de peixes são escassos na literatura.

O protocolo de força frequência revelou que os valores de Fc apresentados pelo grupo EL foram superiores aos do grupo CT em todas as frequências de estimulação, padrão que se intensificou com o aumento de frequência. Tais resultados mostram não apenas que o exercício

leve foi capaz de promover um incremento relevante na capacidade de geração de tensão isométrica como também manter tal aumento sob frequências de estimulação elevadas. No grupo CT, a inibição funcional do NCX promoveu reduções significantes nos valores de Fc entre 1,0 e 1,4Hz e no grupo EL entre 0,6 e 0,8Hz. Tais resultados indicam que o grupo EL se mostrou mais dependente do NCX para desempenhar contrações em frequências elevadas, sugerindo, também, que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via este trocador assumiu um papel de maior relevância durante as contrações.

Em peixes, o NCX pode atuar de forma relevante durante o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  transsarcolemal (GAMPERL; FARRELL, 2004). O NCX atua em seu modo reverso em uma faixa estreita de voltagem durante um potencial de ação (PA), quando a face interna da sarcolema se encontra entre aproximadamente 0-10 mV, sendo que a constituição delgada dos cardiomiócitos de peixes bem como a grande concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular ( $[\text{Na}^+]_i$ ) favorecem o influxo de uma grande quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  por este trocador (BIRKEDAL; SHIELS, 2007). Em espécies de peixes como a carpa (*Carassius carassius*) e truta (*Oncorhynchus mykiss*) a atuação apenas do NCX é suficiente para gerar uma contração parcial do miócito (HOVE-MADSEN et al., 2003; VORNANEN, 1999). A maior relevância funcional do NCX para a geração de força é também corroborada pela maior taxa de expressão deste trocador descrita no presente trabalho.

Ademais, no grupo CT a inibição funcional do RS causou reduções significantes apenas em uma faixa restrita de frequências (0,2-0,6Hz) enquanto que no grupo EL foram constatadas reduções na maioria das frequências analisadas (0,2-1,8Hz). Tais resultados indicam que no grupo EL o RS também assumiu maior relevância para a geração de força, embora as taxas de expressão da SERCA2 apresentadas por esse grupo tenham sido inferiores em relação ao grupo CT.

Em adição ao aumento na capacidade de geração de força, o exercício leve também induziu melhorias na dinâmica de contração ( $R_{TPT}$ ) e relaxamento ( $R_{TR50}$ ) das tiras ventriculares

em todas as frequências analisadas. No entanto, após a inibição funcional no NCX os valores tanto de  $R_{TPT}$  quanto os de  $R_{TR50}$  não diferiram entre os grupos, indicando que a maior expressão e/ou atividade do NCX pode ter contribuído para os incrementos nas dinâmicas de contração e relaxamento. Ademais, a grande redução nos valores  $R_{TR50}$  apresentada por ambos os grupos após a inibição funcional do NCX comprova o papel essencial deste trocador durante o relaxamento dos miócitos.

Com a inibição do RS, os valores  $R_{TPT}$  foram superiores no grupo EL apenas em frequências de estimulação elevadas (1,4-1,6Hz), sugerindo que o NCX e/ou os LTCCs foram capazes de gerar contrações mais dinâmicas nesse grupo mesmo em frequências mais elevadas. Entretanto, ao contrário do observado na comparação entre os grupos em condição padrão, os valores de  $R_{TR50}$  não diferiram entre os grupos após a inibição funcional do RS. Tal resultado indica que o incremento na dinâmica de relaxamento descrito no grupo EL decorreu de uma maior participação do RS para a captura de  $Ca^{2+}$  durante o relaxamento. Propõe-se que o papel do RS em peixes seja complementar o influxo de  $Ca^{2+}$  via SL, sendo especialmente importante em espécies ativas que apresentam  $f_H$  elevadas (SHIELS et al., 1999). Desta forma, o RS possibilita o desenvolvimento de uma maior dinâmica de contração do miócito, o que é necessário em demandas cardíacas aumentadas (SHIELS; FARRELL, 2000).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram tal afirmação, uma vez que o RS se mostrou importante para o desenvolvimento de valores mais elevados de  $R_{TR50}$  após o treinamento de exercício leve. Entretanto, taxas menores de expressão da SERCA2 acompanhadas pela manutenção das taxas de expressão do PLB pode indicar uma modulação diferencial sobre a SERCA2 em função do treinamento em matrinxã. O PLB é uma fosfoproteína associada ao RS que regula a atividade da SERCA2. Quando se encontra no estado defosforilado, a PLB inibe a atividade da SERCA2, no entanto, uma vez fosforilada por uma enzima quinase dependente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina (CaMKII) e outras vias, a PLB passa a

estimular a atividade da SERCA2 (CERRA; IMBROGNO, 2011). A fosforilação da PLB via CaMKII é acionada durante aumentos na  $[Ca^{2+}]_i$  citosólico (KRANIAS; HAJJAR, 2012).

Dado o aspecto inibitório da PLB sobre a SERCA2, em cardiomiócitos de mamíferos, aumentos na expressão da PLB em relação a SERCA2 (maior razão PLB/SERCA) são comumente associadas com diminuições na afinidade da SERCA2 pelo  $Ca^{2+}$  e deficiências no estoque de  $Ca^{2+}$  pelo RS (HAGHIGHI et al., 2003), causando aumentos no tempo de relaxamento e reduções na contractilidade (KADAMBI et al., 1996; MEYER et al., 1999). Entretanto, apesar da maior razão PLB/SERCA2 encontrada no presente trabalho, aumentos nos valores de  $F_c$ ,  $R_{TPT}$  e  $T_{TR50}$  foram descritos no grupo EL.

Com base nos dados *in vitro*, o influxo de  $Ca^{2+}$  através do NCX se mostrou importante para o desenvolvimento dos maiores valores de  $F_c$ , promovendo maiores  $[Ca^{2+}]_i$  durante as contrações. Uma vez que maiores  $[Ca^{2+}]_i$  podem ativar CaMKII e, conseqüentemente, promover a fosforilação da PLB, pode-se sugerir que uma maior razão PLB/SERCA2 possa ser uma modulação capaz de promover a ativação da SERCA2 em níveis mais elevados de  $[Ca^{2+}]_i$ . Ademais, os resultados *in vitro* indicam que a elevada razão PLB/SERCA2 encontrada no grupo EL não afetou sua capacidade de acumulação de  $Ca^{2+}$  no RS.

Em conclusão, o exercício leve promoveu melhoramentos significantes na contratilidade ventricular de matrinxã, promovendo aumentos na geração de força, na capacidade de bombeamento bem como na dinâmica de contração e relaxamento. O NCX se mostrou essencial para o relaxamento, entretanto, no grupo EL, a inibição deste trocador também acarretou em reduções na capacidade de geração de força contrátil, indicando que o influxo de  $Ca^{2+}$  via este trocador se mostrou mais relevante após o treinamento de exercício. Os resultados indicam que os animais exercitados contaram com uma maior participação do RS tanto durante a contração quanto durante o relaxamento dos miócitos. O treinamento de exercício leve promoveu maiores taxas de expressão do NCX e menores taxas de expressão da SERCA2, mas não alterou a expressão do PLB, indicando a existência de um processo de

modulação diferencial da SERCA2. Em conjunto os dados obtidos revelam que mesmo intensidades leves de exercício podem desencadear modulações no processo de acoplamento E-C capazes de elevar a capacidade contrátil ventricular de matrizã.

## 4.2. Grupo de exercício moderado (EM)

### 4.2.1. Resultados

#### 4.2.1.1 Características biométricas

Os valores absolutos de massa (Wb – g) e comprimento (Lb – cm) corporais dos grupos experimentais CT e EM, antes e depois dos 60 dias experimentais, são apresentados na Tabela 2. Esta tabela também apresenta os valores de Wb e Lb de ambos os grupos após 60 dias experimentais, expressos como % dos valores iniciais. A normalização de Wb e Lb (% valores iniciais) mostrou não haver diferença significativa entre os valores do grupo CT antes e depois de 60 dias Wb ( $2,6 \pm 0,7$  %) e Lb ( $1,4 \pm 0,7$  %). Entretanto, para o grupo EM, os aumentos na Wb ( $18,8 \pm 2,6$  %) e Lb ( $8,3 \pm 0,8$  %) foram significativos (Mann-Whitney,  $P < 0,0004$ ). Os valores de MVR não variaram entre os grupos CT e EM ( $P > 0,05$ ).

Tabela 2-Valores de massa (Wb – g) e comprimento (Lb – cm) corpóreas dos grupos experimentais CT e EM, antes e depois dos 60 dias experimentais.

Parâmetro	Grupo CT		Grupo EM	
	Inicial	Após 60 dias	Inicial	Após 60 dias
<b>Wb (g)</b>	$260,0 \pm 15,2$	$268,2 \pm 16,2$	$286,5 \pm 13$	$336,6 \pm 11$
<b>Wb (%)</b>	$2,6 \pm 0,7$		$18,8 \pm 2,6$	
<b>Lb (cm)</b>	$25,1 \pm 1,5$	$26,2 \pm 0,47$	$26,1 \pm 0,4$	$28 \pm 0,34$
<b>Lb (%)</b>	$1,4 \pm 0,5$		$8,3 \pm 0,8$	
<b>MVR (%)</b>	$0,073 \pm 0,003$		$0,074 \pm 0,002$	

#### 4.2.1.1. Efeitos da frequência de estimulação sobre os parâmetros contráteis.

A Figura 14 mostra a comparação entre os valores (média  $\pm$  EPM) de tensão de contração ( $F_c$ -mN.mm<sup>-2</sup>) e capacidade de bombeamento cardíaco (CBC-mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>) apresentados pelos grupos CT e EM bem como os valores apresentados por esses grupos em pré-tratamento com lítio (grupo+Li) e rianodina (grupo + Ryan). Os valores de  $F_c$  em EM foram ~30% superiores aos de CT entre 0,2 e 1,4 Hz ( $P < 0,05$ ) (Figura 14A). Em EM+Li os valores de  $F_c$  foram inferiores ( $P < 0,05$ ) aos apresentados por CT+Li em todas as frequências suportadas (0,2- 0,8 Hz) (Figura 14B). Em EM+Ryan, a  $F_c$  diminuiu ( $P < 0,05$ ) em relação aos valores encontrados em 0,2 Hz em todas frequências as superiores à 1,2 Hz e também apresentou uma redução a frequência máxima suportada (1,8 Hz) quando comparado com CT+Ryan (2,0 Hz) (Figura 14C). Valores superiores de  $F_c$  foram encontrados em EM+Ryan (+53-+43%,  $P < 0,05$ ) em comparação a CT+Ryan na faixa de frequência entre 0,2 e 1,0 Hz (Figura 14C).

O grupo EM apresentou valores de CBC ~40% maiores ( $P < 0,05$ ) em relação a CT em todas as frequências de estimulação (Figura 15A). CT+Li apresentou valores maiores de CBC entre 0,6 e 2,0 Hz em comparação aos valores iniciais encontrados à 0,2 Hz (Figura 15B). Incrementos na frequência de estimulação não causaram alterações nos valores de CBC em EM+Li (Figura 15B). Ademais, os valores de CBC encontrados em EM+Li foram 40% menores ( $P < 0,05$ ) em relação aos de CT+Li em todas as frequências (Figura 15B). A comparação entre os valores de CBC apresentados por EM+Ryan e CT+Ryan mostraram que o grupo exercitado apresentou valores ~50% superiores ( $P < 0,05$ ) em todas as frequências inferiores a 1,4 Hz (Figura 15C).



Figura 14- Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de força de contração ( $F_c$ -mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderado (EM, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*). Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental.

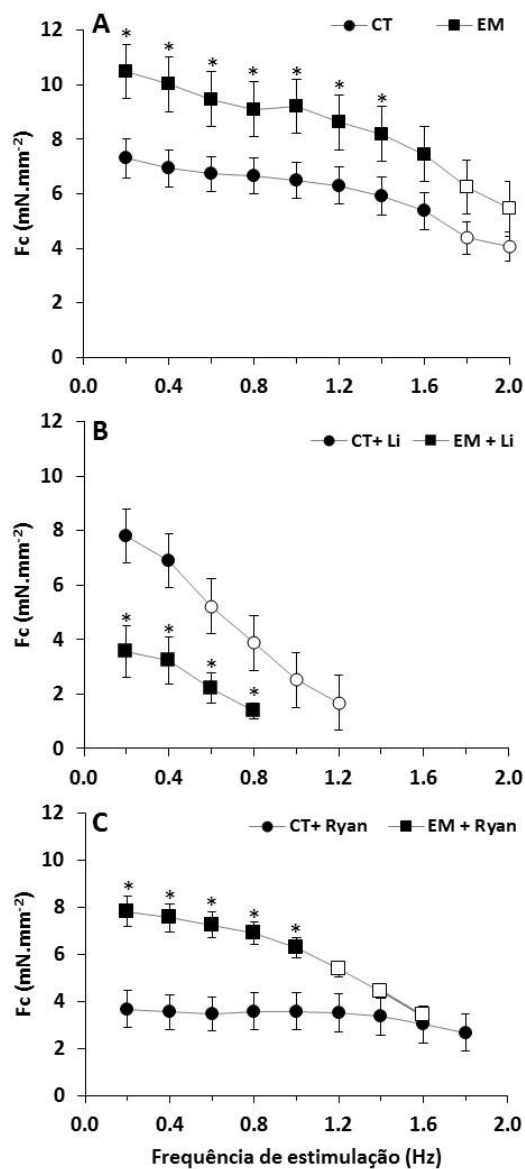
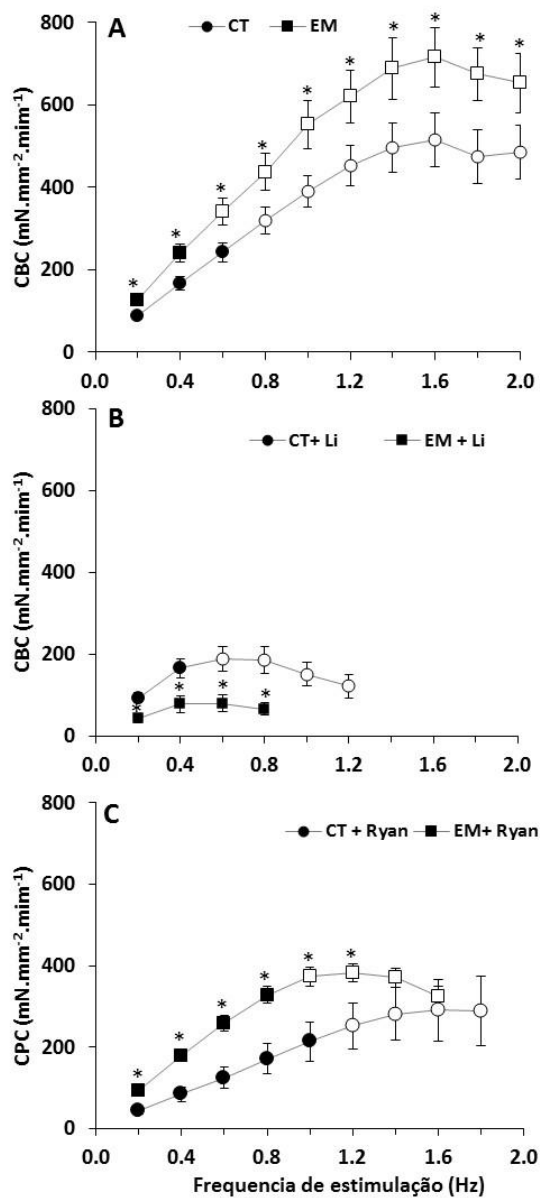


Figura 15- Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC-mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderado (EM, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painel A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painel B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painel C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação (\*). Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental.



A Figura 16 mostra os valores (média  $\pm$  EPM) da taxa para o pico de tensão ( $R_{TPT}$ -  $mN.mm^{-2}.s^{-1}$ ) e taxa para 50% do relaxamento ( $R_{TR50}$ -  $mN.mm^{-2}.s^{-1}$ ) dos grupos CT e EM e os efeitos do pré-tratamento com rianodina (grupo+Ryan) ou lítio (grupo+Li). Em ambos os grupos CT e EM (Figura 16A), os valores médios de  $R_{TPT}$  registrados após incrementos de frequência (0,4-2,0 Hz) não apresentaram alterações em comparação aos seus respectivos valores encontrados na frequência 0,2Hz. Adicionalmente, os valores médios de  $R_{TPT}$  apresentados por EM foram  $\sim 32\%$  maiores ( $P < 0,05$ ) do que os de CT em toda a faixa de frequência analisada (0,2-2,0Hz) (Figura 16A). Com os incrementos na frequência de estimulação, CT+Li apresentou valores médios constantes de  $R_{TPT}$  até 0,8Hz, apresentando decréscimos entre 1,0-1,2Hz em comparação ao valor encontrado em 0,2Hz ( $P < 0,05$ ) (Figura 16B). Em adição, EM+Li apresentou valores inferiores de  $R_{TPT}$  em comparação com CT+Li ( $\sim 60\%$ ;  $P < 0,05$ ) em todas as frequências suportadas pelos grupos (Figura 16B). Com os incrementos de frequência, CT+Ryan apresentou valores constantes de  $R_{TPT}$  (Figura 16C). No entanto, EM+Ryan (Figura 16C) apresentou decréscimos na  $R_{TPT}$  entre 1,0-1,6Hz em comparação aos valores encontrados em 0,2Hz ( $P < 0,05$ ). EM+Ryan apresentou valores médios superiores de  $R_{TPT}$  (entre +42 e +34%;  $P < 0,05$ ) em relação a CT+Ryan apenas entre 0,2-1,0Hz, entretanto, não apresentando diferenças entre os valores encontrados em frequências mais elevadas (Figura 16C).

Em ambos CT e EM, os valores médios de  $R_{TR50}$  não apresentaram variações durante os incrementos de frequência (0,4-2,0Hz) em comparação aos valores obtidos para cada grupo na frequência de 0,2Hz (Figura 17A). Os valores médios de  $R_{TR50}$  não diferiram entre CT e EM (Figura 17A). Em EM+Li, os valores de  $R_{TR50}$  foram  $\sim 20\%$  menores ( $P < 0,05$ ) que os de CT+Li em todas as frequências suportadas (Figura 17B). Tanto CT+Ryan quanto EM+Ryan apresentaram valores médios constantes de  $R_{R50}$  em toda a faixa de frequências suportadas por cada grupo e a comparação entre EM+Ryan e CT+Ryan não revelou diferenças (Figura 17C) ( $P > 0,05$ ).

Figura 16- Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) da taxa para pico de tensão ( $R_{TPT}$ -mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderado (EM, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*). Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental.

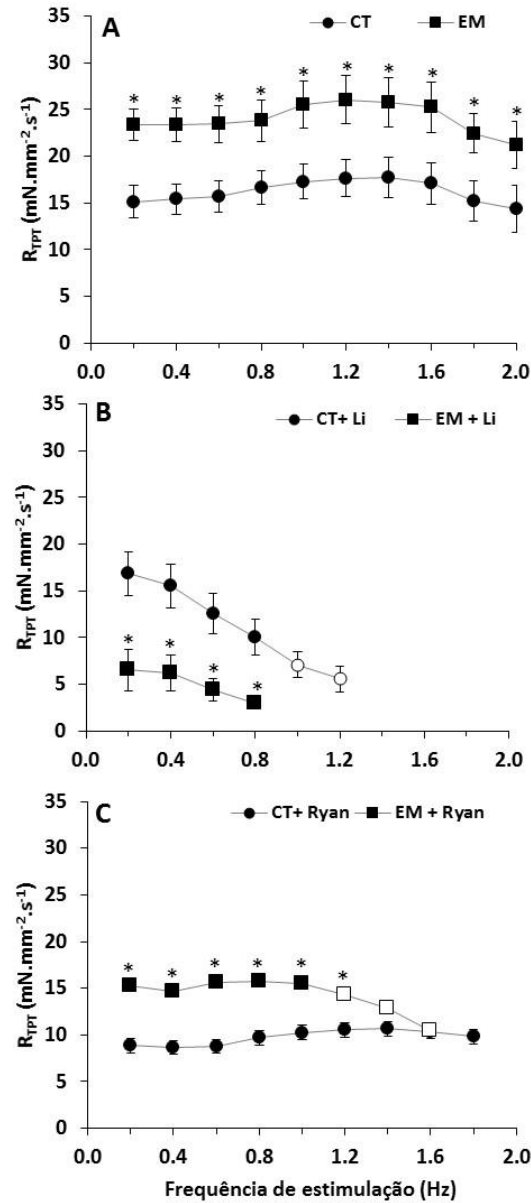
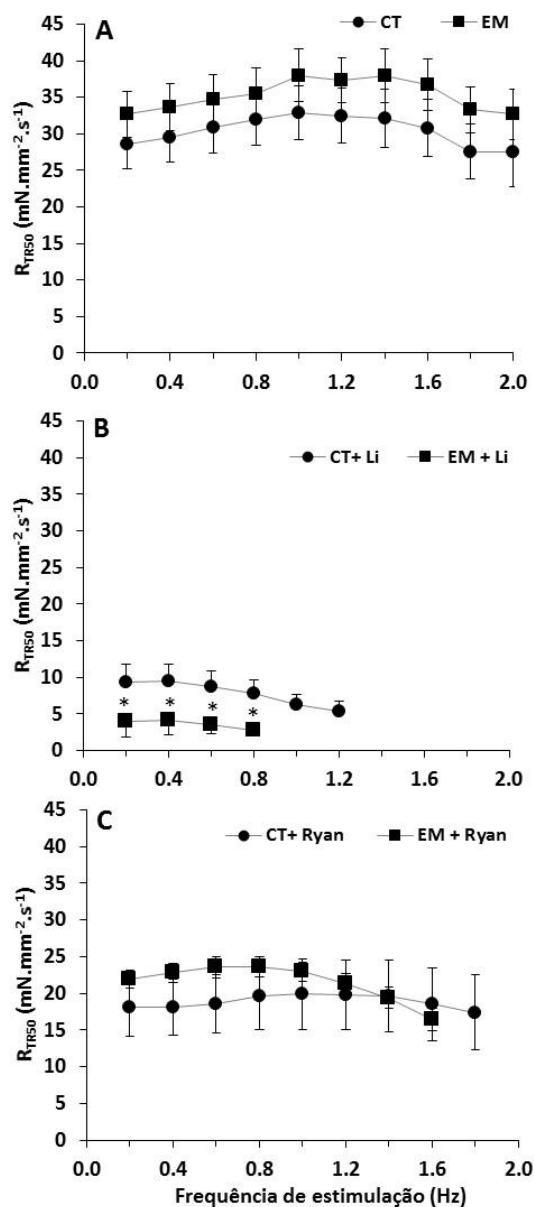
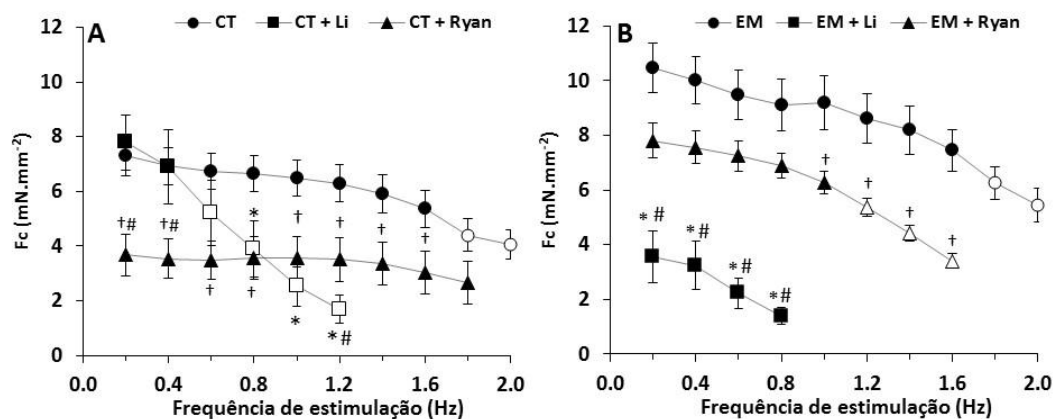


Figura 17- Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) da taxa para 50% de relaxamento ( $R_{TR50}$ -mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderado (EM, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com Lítio (grupo+Li). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*).



A Figura 18 mostra os valores (média  $\pm$  EPM) da tensão de contração (Fc-mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos CT e EM em comparação com os efeitos do lítio (grupo+Li) e rianodina (grupo+Ryan) obtidos para cada grupo. Tanto em CT quanto em EM os incrementos na frequência de estimulação causaram reduções nos valores de Fc entre 0,4 e 1,6 Hz em comparação aos valores encontrados em 0,2Hz (P < 0,05) (Figura 18A e B). Os valores Fc encontrados em CT+Li foram menores em todas as frequências acima de 0,4Hz em comparação aos valores encontrados em 0,2 Hz (P < 0,05). CT+Ryan apresentou diminuições na Fc apenas em 1,8Hz e EM+Ryan apresentou diminuições nesse parâmetro entre 1,2 e 1,6Hz. Os valores encontrados em CT+Li foram progressivamente menores (P < 0,05) em comparação aos de CT em todas as frequências entre 0,6 e 1,2Hz (-41% em 0,8Hz, -61% em 1,0Hz e -73% em 1,2Hz). Ademais, a frequência máxima suportada por CT+Li foi inferior em relação a CT (2,0Hz) (Figura 18A). Em CT+Ryan, não apenas a frequência máxima suportada (1,8 Hz) foi ligeiramente menor em relação a CT (2,0 Hz), mas também os valores médios de Fc foram ~50% menores que os de CT entre 0,2 e 1,6Hz (Figura 18A). CT+Li apresentaram valores médios de Fc ~50% superiores em comparação a CT+Ryan entre 0,2 e 0,4Hz (P < 0,05) e valores 52% inferiores na frequência de 1,2Hz (P < 0,05). Por outro lado, EM-Li apresentou uma redução marcante na frequência máxima suportada (0,8Hz) em comparação do EM (2,0Hz) e também apresentou valores de Fc notavelmente menores (P < 0,01) em todas as frequências suportadas (-66% em 0,2 Hz, -68% em 0,4 Hz, -76% em 0,6 Hz e -84% em 0,8 Hz) (Figura 18B). A frequência máxima suportada em EM+Ryan (1,6 Hz) foi também menor do que em EM (2,0 Hz). Em adição, os valores de Fc apresentados pelo grupo EM+Ryan foram significativamente menores em relação aos de EM nas frequências de 1,0 (-31%), 1,2 (-37%), 1,4 (-45%) e 1,6 Hz (-54%) (Figura 18B). EM-Li apresentou valores de Fc inferiores (P < 0,01) em relação aos de EM+Ryan em todas as frequências suportadas (-54% em 0,2 Hz, -57% em 0,4 Hz, -69% em 0,6 Hz, e -79% em 0,8 Hz) (Figura 18B).

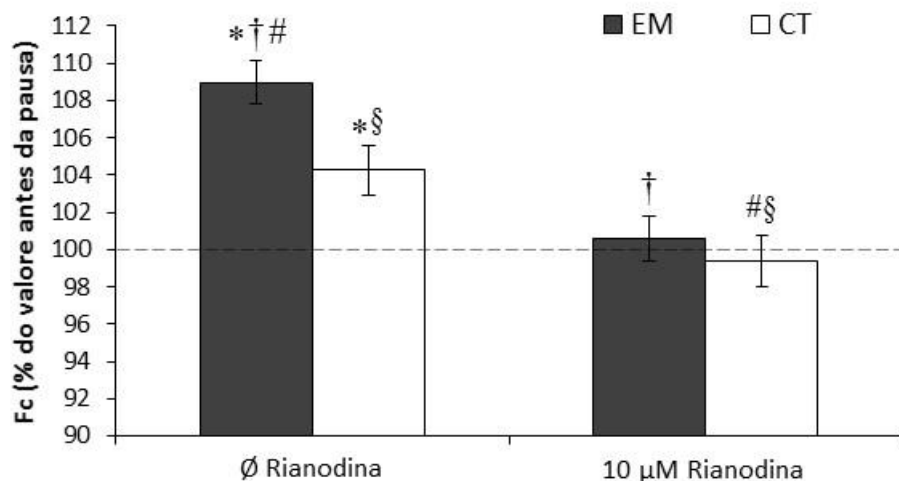
Figura 18- Valores (média  $\pm$  E.P.M) de força de contração ( $F_c$ -mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) e Exercício moderado (EM, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Pannel A- comparação entre os valores apresentados pelo grupo controle (CT, n=10) em condições padrão e após o tratamento com Lítio (CT+Li) e 10  $\mu$ M de Rianodina (CT+Ryan). Pannel B- comparação entre os valores apresentados pelo grupo Exercício moderado em condições padrão (EM, n=10) e após o tratamento com Lítio (EM+Li) e 10  $\mu$ M de Rianodina (EM+Ryan). (\*) indica diferença entre os grupos em condição padrão e grupo+Li, (†) diferença entre grupo padrão e grupo+Ryan, (#) diferença entre grupo+Li e grupo+Ryan.



#### 4.2.1.2. Contração pós-pausa

Os valores de contração pós-pausa (PRC- % $F_c$ ) apresentados pelos strips ventriculares ( $n = 8$ ) dos grupos EM e CT a 0,2 Hz após a interrupção de 30s na frequência de estimulação em solução fisiológica padrão e em pré-tratamento com rianodina são mostradas na Figura 19. Em solução padrão, ambos os grupos apresentaram incrementos nos valores de PRC. Os valores médios apresentados pelo grupo EM ( $109 \pm 2\%$ ) foram significativamente maiores que CT ( $104 \pm 1\%$ ) ( $P < 0,05$ ). Quando tratadas com rianodina as tiras não apresentaram incrementos nos valores de PCR em ambos os grupos. Os valores médios apresentados por EM foram maiores ( $P < 0,05$ ) que os apresentados por EM+Ryan ( $100 \pm 0,5\%$ ) e CT+Ryan ( $99 \pm 1,6\%$ ). Ademais, o grupo CT apresentaram valores significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos de CT+Ryan.

Figura 19- Contração pós-pausa (PRC-% Fc) dos grupos CT (n=8) e EM (n=8) em condição padrão e após o tratamento com rianodina. Os valores obtidos após a pausa foram normalizados com os últimos valores apresentados antes da pausa de 30s (0,2Hz). Os valores estão apresentados em médias  $\pm$  E.P.M. Os símbolos indicam diferenças estatísticas  $P < 0,05$ , (\*) indica diferença entre EM e CT, (†) indica diferença entre EM e EM+Ryan, (#) indica diferença entre EM e CT+Ryan e (§) indica diferença entre CT e CT+Ryan.

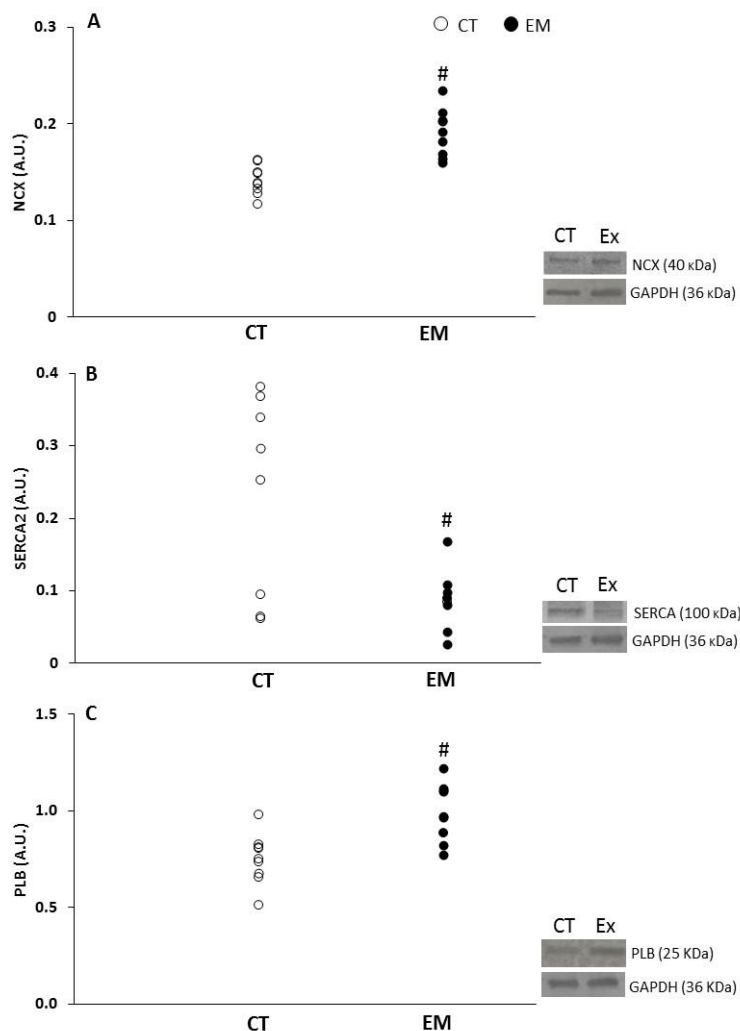


#### 4.2.1.3. Análise proteica por Western Blotting

A comparação entre os níveis expressão das proteínas de manejo de  $Ca^{2+}$  NCX, SERCA2 e PLB encontradas na musculatura ventricular em indivíduos de *B. amazonicus* dos grupos EM e CT são apresentados na Figura 20, a expressão de cada banda está representada em pontos univariados. Os níveis de GAPDH não variaram entre os grupos. EM apresentou maiores níveis ( $P < 0,05$ ) de NCX (+15%) e PLB (+21%) em comparação ao grupo CT. Por outro lado, os níveis de SERCA2 foram 65% menores em EM em comparação ao grupo CT ( $P < 0,01$ ).



Figura 20- Comparação entre os valores médios das taxas de expressão do NCX, PLB e SERCA2 de tecido ventricular de *B. amazonicus* (n=6) dos grupos CT e EM. Valores são apresentados em unidades arbitrárias (U.A.  $\pm$  E.P.M) calculadas a partir da normalização das densidades ópticas obtidas para as proteínas analisadas em função dos valores de densidade de GAPDH das respectivas amostras. **A-** comparação entre as taxas de expressão do NCX. **B-** comparação entre as taxas de expressão do SERCA2. **C-** comparação entre as taxas de expressão da PLB. (#) indica diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os diferentes grupos.



#### 4.2.2. Discussão

Este foi o primeiro estudo publicado (publicação em anexo) a determinar os papéis funcionais do NCX e RS em *B. amazonicus* submetidos à ambas as condições: atividade de nado em água estática (CT) e após a submissão por 60 dias à atividade natatória (EM). Ademais, este estudo gerou dados a respeito das modulações no acoplamento E-C induzidas pelo exercício em uma espécie de peixe neotropical muito ativa. No presente estudo, as melhorias

na contractilidade ventricular *in vitro* encontradas em EM não foram seguidas por elevações na MVR. Em adição, Castro et al. (2013), avaliando os efeitos de 70 dias ao exercício moderado (0,65 CC.s<sup>-1</sup>) e intenso (1,31 CC.s<sup>-1</sup>) sobre o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), não encontraram aumentos significativos na MVR. Considerando-se que no presente estudo os maiores valores de Fc e CBC não foram acompanhados por aumentos na MVR, pode-se sugerir que os aumentos em tais parâmetros contráteis são decorrentes de melhorias no manejo de Ca<sup>2+</sup> nos cardiomiócitos e não pelo aumento na quantidade de filamentos contráteis.

Em ambos os grupos a relação força-frequência negativa, comumente apresentada pela maioria das espécies de teleósteos já estudadas, foi observada apenas nas frequências superiores a 1.6 Hz (96bpm). De acordo com Monteiro et al. (2013), a frequência cardíaca ( $f_H$ ) de matrinxã, determinada *in vivo* e em normóxia foi por volta de 65 bpm (~1,1 Hz), no entanto, não existem dados na presente literatura a respeito da faixa de  $f_H$  desempenhada por esse espécie após o treinamento de exercício. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo apresentam evidências de os cardiomiócitos de matrinxã apresentam a capacidade de suportar elevadas frequências de estimulação.

A melhoria na dinâmica contrátil, evidenciada pelos maiores valores gerais de  $R_{TPT}$ , também podem indicar que os miofilamentos desenvolveram aumentos na capacidade de manejo de Ca<sup>2+</sup> após o treinamento de exercício. Interessante notar que não foram observadas diferenças nos valores de  $R_{TR50}$  tanto na comparação em cada grupo separadamente após os incrementos na frequência quanto na comparação entre os diferentes grupos experimentais. Esta falta de alterações no valores de  $R_{TR50}$  pode indicar que o relaxamento do miócito em *B. amazonicus* apresenta uma taxa constante e otimizado (~39 mN.mm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) apesar da intensidade da frequência de estimulação ou do valor de Fc desempenhado. Uma vez que maiores valores de Fc foram encontrados no grupo EM, pode-se sugerir que as preparações deste grupo estão mobilizando maiores [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durante as contrações. Desta forma, a manutenção de valores

constantes de  $R_{TR50}$  foi mantida pela maior expressão e/ou atividade do NCX ou por uma maior atividade da SERCA2, visto que a rianodina reduziu os valores de  $R_{TR50}$  em EM.

A redução na dinâmica de relaxamento causada pelo tratamento com solução de  $Li^+$ , mostrada pelos valores menores de  $R_{TR50}$ , foi um resultado esperado, uma vez que o NCX é o principal responsável pela extrusão de  $Ca^{2+}$  durante o processo de relaxamento em cardiomiócitos de peixes (BERS, 2008; HOVE-MADSEN; TORT, 2001; IMBERT-AUVRAY et al., 2013; VORNANEN; SHIELS; FARRELL, 2002). Ademais, o impacto elevado do  $Li^+$  sobre a dinâmica de relaxamento de ambos os grupos EM e CT confirma o papel essencial da extrusão de  $Ca^{2+}$  via NCX para o relaxamento miocárdico de matrinxã. Em conformidade, os valores mais elevados de  $R_{TR50}$  encontrados em EM durante o bloqueio funcional do RS pode ser explicado pela maior expressão do NCX nesse grupo, a qual poderia promover um efluxo mais eficiente de  $Ca^{2+}$  mesmo sem uma participação efetiva do RS para o relaxamento.

Entretanto, também durante o bloqueio funcional do RS, o grupo EM apresentou valores superiores de Fc, CBC e  $R_{TPT}$  em comparação ao CT em uma ampla faixa de frequências de estimulação (0.2- 1.0Hz) sugerindo que a contractilidade aumentada encontrada em EM por ser atribuída a aumentos do influxo de  $Ca^{2+}$  através do NCX e/ou LTCCs. Em muitas espécies de peixe, o influxo de  $Ca^{2+}$  via LTCCs é a principal fonte deste íon para a contração miocárdica (VORNANEN, 1997, 1998) e, embora o papel parcial destes canais não tenham sido investigados diretamente no presente trabalho, pode-se sugerir que sua maior expressão ou atividade possa ser responsável pelas melhorias contráteis promovidas pelo exercício.

Em adição, a inibição funcional do NCX nas preparações ventriculares do grupo EM reduziram os valores de Fc, CBC e  $R_{TPT}$  em comparação com os apresentados por CT mesmo em frequências de estimulação baixas (0,2-0,8Hz). Tais resultados, acompanhados pela maior taxa de expressão do NCX encontrada em EM, pode sugerir que o modo reverso do NCX pode apresentar um papel para o desenvolvimento de tensão contrátil nos animais submetidos ao treinamento de exercício. No entanto, o papel do NCX durante o influxo de  $Ca^{2+}$  bem como

para a ativação da CICR durante a contração cardíaca de peixes ainda não é completamente conhecida, podendo também variar entre espécies (LARBIG et al., 2010). Trabalho prévios relataram que o modo reverso do NCX contribui grandemente para o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em algumas espécies de peixe, sendo 30-50% em carpa (*Carassius carassius*) e 70% em burbot (*Lota lota*) (SHIELS; PAAJANEN; VORNANEN, 2006; VORNANEN, 1999a). Hove-Madsen et al. (2003) também descreveram que em miócitos atriais de truta arco-íris o modo reverso do NCX contribui de forma relevante para o CICR. Com base nestes dados, uma vez que no presente trabalho foi encontrado que o RS apresenta uma grande importância durante a contração ventricular, pode-se sugerir que uma inibição no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via NCX também tenha causado um comprometimento da ativação da CICR em peixes exercitados.

Entretanto, como o método utilizado no presente trabalho para a inibição funcional do NCX,  $\text{Li}^+$  substituindo  $\text{Na}^+$  na solução fisiológica, não foi específico para a inibição do modo reverso do NCX, a marcante redução causada pela solução com  $\text{Li}^+$  na Fc, CBC e  $R_{TPT}$  também pode ser atribuída a um aumento no  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico, o qual poderia alterar o gradiente eletroquímico intracelular e, possivelmente, diminuir o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos LTCCs (JANVIER; BOYETT, 1996; VASSALLE; VASSALLE; LIN, 2004). A esse respeito, análises posteriores utilizando-se inibidores específicos do modo reverso do NCX e LTCCs são necessários para elucidar a relevância relativa de tais componentes em peixes exercitados.

Em animais CT, a inibição funcional do RS reduziu a produção de tensão absoluta em ~50% na maioria das frequências de estimulação. Esta diminuição na tensão foi maior que a reportada para espécies de grande desempenho de nado como a cavala (~20%) e atuns (30-40%) (KEEN et al., 1992; SHIELS et al., 1999; SHIELS; FARRELL, 2000). Este resultado também corrobora a hipótese corrente de que espécies capazes de desempenhar nado vigoroso apresentam maiores contribuições relativas do RS na contração cardíaca (AHO; VORNANEN, 1999; IMBERT-AUVRAY et al., 2013; KEEN et al., 1992; RIVAROLI; RANTIN; KALININ, 2006; SHIELS et al., 1999).

Entretanto, no grupo EM, diminuições nos valores de Fc decorrentes do tratamento com rianodina foram ausentes em baixas frequências de estimulação (0,2-0,8Hz), mas ocorreram de forma significativa (entre 31 e 54%) entre 1,0 e 1,6 Hz. Uma vez que, com a inibição do RS, os componentes sarcolemas são os únicos doadores de  $Ca^{2+}$  restantes é provável que os maiores valores de Fc descritos em EM sob frequências de estimulação subfisiológicas foram promovidos pelo modo reverso do NCX ou pelos LTCCs. Por outro lado, em frequências de estimulação próximas da  $f_H$  encontrada para matrinxã *in vivo* (1,1 Hz; MONTEIRO et al., 2013), o real papel do RS pode ser acessado. Entretanto, como a diminuição na Fc causada na rianodina foi estável em CT em todas as frequências, pode-se propor que o papel relativo do RS como doador de  $Ca^{2+}$  foi dependente da frequência de estimulação em EM. Tais resultados podem indicar uma modulação na dependência do RS em função da  $f_H$  apresentada por matrinxã após o exercício.

Apesar da escassez de dados funcionais a respeito da contratilidade cardíaca em peixes exercitados, um padrão similar de dependência do RS foi descrito para *Solea solea* após a aclimação ao frio (12 e 18°C). Nesta espécie, o tratamento com rianodina reduziu a Fc em preparações ventriculares em ~15% à 0,2Hz e ~50% à 1,2 e 1,6Hz, indicando uma relevância aumentada do RS durante frequências elevadas (IMBERT-AUVRAY et al., 2013). Tais autores, portanto, atribuíram este ajuste à diferenças na expressão/atividade dos RyR e SERCA2 (LANDEIRA-FERNANDEZ et al., 2004; VORNANEN, 2006).

Ademais, Castro et al. (2013) analisaram a transcrição gênica dos LTCCs, RyR, SERCA2 e calsequestrina (uma proteína fixadora de  $Ca^{2+}$  presente no interior do RS) no coração do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) após o exercício, relatando aumentos significativos nas expressões apenas de LTCCs e calsequestrina. Os autores sugeriram que, nesta espécie, o exercício promoveu melhorias no influxo de  $Ca^{2+}$  sarcolemal através de aumentos LTCCs, bem como melhorias na capacidade de manejo de  $Ca^{2+}$  no RS.

No presente estudo, entretanto, a diminuição nas taxas de expressão da SERCA2 acompanhadas por taxas aumentadas de PLB pode também indicar uma modulação diferencial sobre a SERCA2 em função do treinamento em matrizã. Como mencionado previamente, a PLB é uma fosfoproteína associada ao RS que regula a atividade da SERCA2. Quando se encontra no estado defosforilado, a PLB inibe a atividade da SERCA2, no entanto, uma vez fosforilada por uma enzima quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (CaMKII) e outras vias, a PLB passa a estimular a atividade da SERCA2 (CERRA; IMBROGNO, 2011). A fosforilação da PLB via CaMKII é acionada durante aumentos na  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico (KRANIAS; HAJJAR, 2012).

Dado o aspecto inibitório da PLB sobre a SERCA2, em cardiomiócitos de mamíferos, aumentos na expressão da PLB em relação a SERCA2 (maior razão PLB/SERCA) são comumente associadas com diminuições na afinidade da SERCA2 pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e deficiências no estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (HAGHIGHI et al., 2003), causando aumentos no tempo de relaxamento e reduções na contractilidade (KADAMBI et al., 1996; MEYER et al., 1999). Entretanto, apesar da maior razão PLB/SERCA2 encontrada no presente trabalho, aumentos nos valores de Fc e  $R_{\text{TPT}}$ , bem como nenhuma alteração na  $T_{\text{TR50}}$  foram descritas no grupo EM.

Como discutido previamente, possivelmente o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através do NCX e LTCCs se tornou essencial para o desenvolvimento dos maiores valores de Fc, promovendo maiores  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante as contrações. Uma vez que maiores influxos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  podem ativar CaMKII e, conseqüentemente, promover a fosforilação da PLB, pode-se sugerir que uma maior razão PLB/SERCA2 possa ser uma modulação capaz de promover a ativação da SERCA2 em níveis mais elevados de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Ademais, a avaliação da PRC descreve a capacidade máxima acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (HOLUBARSCH, 2002). Tanto o grupo CT quanto EM apresentaram uma potencialização na PRC após a pausa de 30s, um resultado que foi completamente inibido pelo tratamento com rianodina. A comparação entre os valores de PRC apresentados por CT e EM revelou que o treinamento de exercício promoveu uma elevação na capacidade de estoque de

$\text{Ca}^{2+}$  do RS, indicando que a elevada razão PLB/SERCA2 não afetou sua capacidade de acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Em conclusão, este foi o primeiro estudo a analisar funcionalmente os efeitos do exercício natatório induzido sobre o acoplamento E-C de uma espécie de peixe. O exercício desencadeou melhoramentos significantes na contratilidade ventricular de matrinxã, promovendo aumentos na geração de tensão, na capacidade de bombeamento bem como na dinâmica de contração e relaxamento. O NCX se mostrou essencial para o relaxamento, no entanto, no grupo EM, a inibição deste trocador também causou uma maior redução em todos os parâmetros contráteis. Ademais, os resultados obtidos indicam que o matrinxã tanto em condições sedentárias quanto após o treinamento de exercício depende de amplamente do RS durante as contrações ventriculares. Entretanto, em animais CT, a contribuição do RS se manteve constante (~50%) em todas as faixas de frequência analisadas, enquanto que, em animais EM, a contribuição do RS (31-54%) foi significativa apenas em frequências elevadas. Tais melhorias foram também associadas com maiores taxas de expressão do NCX e PLB, e menores taxas de expressão da SERCA2. Embora mais análises sejam necessários para determinar o papel parciais do NCX como doador de  $\text{Ca}^{2+}$ , os dados gerados no presente estudo revelam que o matrinxã apresenta uma modulação diferencial do acoplamento E-C após o treinamento de exercício, aumentando a relevância dos componentes sarcolemas em frequências de estimulação baixas e aumentando a relevância do RS em frequências elevadas.

### 4.3. Grupos de exercício moderadamente intenso (EMI) e intenso (EI)

#### 4.3.1. Resultados

##### 4.3.1.1. Características biométricas

Os valores de massa (g) e comprimento (cm) dos animais (n = 16) pertencentes aos grupos CT, EMI e EI antes e após serem submetidos aos diferentes protocolos de exercício constam respectivamente nas Tabelas 3 e 4. No presente trabalho, após os 60 dias dos protocolos experimentais, os animais pertencentes tanto ao grupo EMI quanto ao EI apresentaram taxas de ganho de massa mais elevadas em comparação ao grupo CT ( $P < 0,001$ ). Ademais, a porcentagem de ganho de massa descrita para no grupo EI ( $82,2 \pm 3,1\%$ ) foi superior em comparação com EMI ( $54,1 \pm 2,2\%$ ) ( $P < 0,001$ ). Em relação aos aumento no comprimento corpóreo, apenas os animais pertencentes ao grupo EI apresentaram taxas de crescimento ( $33,6 \pm 3,6\%$ ) mais elevadas ( $P < 0,01$ ) em relação aos grupos EMI ( $11,7 \pm 0,86\%$ ) e CT ( $11,5 \pm 1,05\%$ ), revelando que apenas a velocidade mais alta empregada foi capaz de induzir aumentos neste parâmetro.

Tabela 3-Valores (média  $\pm$  E.P.M) de massa (g) dos grupos Controle (CT, n=16) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=16) e Exercício intenso (EI, n=16) antes e após os protocolos experimentais bem como as porcentagens de aumento apresentadas por cada grupo. (\*) indica diferença estatística entre os estágios inicial e final dos diferentes grupos experimentais.

<b>Grupo</b>	<b>Inicial (g)</b>	<b>Final (g)</b>	<b>Aumento (%)</b>
<b>CT</b>	173,6 $\pm$ 6,4	240 $\pm$ 8*	38,4 $\pm$ 1,2
<b>EMI</b>	239 $\pm$ 7,7	367,6 $\pm$ 11*	54,1 $\pm$ 2,2
<b>EI</b>	194,6 $\pm$ 10	351,1 $\pm$ 14*	82,2 $\pm$ 3,1



Tabela 4- Valores (média  $\pm$  E.P.M) de comprimento (cm) dos grupos Controle (CT, n=16) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=16) e Exercício intenso (EI, n=16) antes e após os protocolos experimentais bem como as porcentagens de aumento apresentadas por cada grupo. (\*) indica diferença estatística entre os estágios inicial e final dos diferentes grupos experimentais.

<b>Grupo</b>	<b>Inicial (cm)</b>	<b>Final (cm)</b>	<b>Aumento (%)</b>
<b>CT</b>	23,3 $\pm$ 0,3	26 $\pm$ 0,3*	11,7 $\pm$ 0,86
<b>EMI</b>	25,2 $\pm$ 0,3	28,1 $\pm$ 0,3*	11,5 $\pm$ 1,05
<b>EI</b>	21,5 $\pm$ 0,4	28,6 $\pm$ 0,4*	33,6 $\pm$ 3,6

#### **4.3.1.2. Massa ventricular relativa**

A massa ventricular relativa (MVR) apresentada pelo grupo CT foi 0,082  $\pm$  0,001%, a apresentada pelo grupo EMI foi 0,074  $\pm$  0,002% e pelo EI foi 0,077  $\pm$  0,002%. Os valores apresentados pelo grupo EMI foram inferiores ( $P < 0,02$ ) em comparação aos de CT. As comparações entre os valores apresentados por CT e EI bem como entre EMI e EI não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

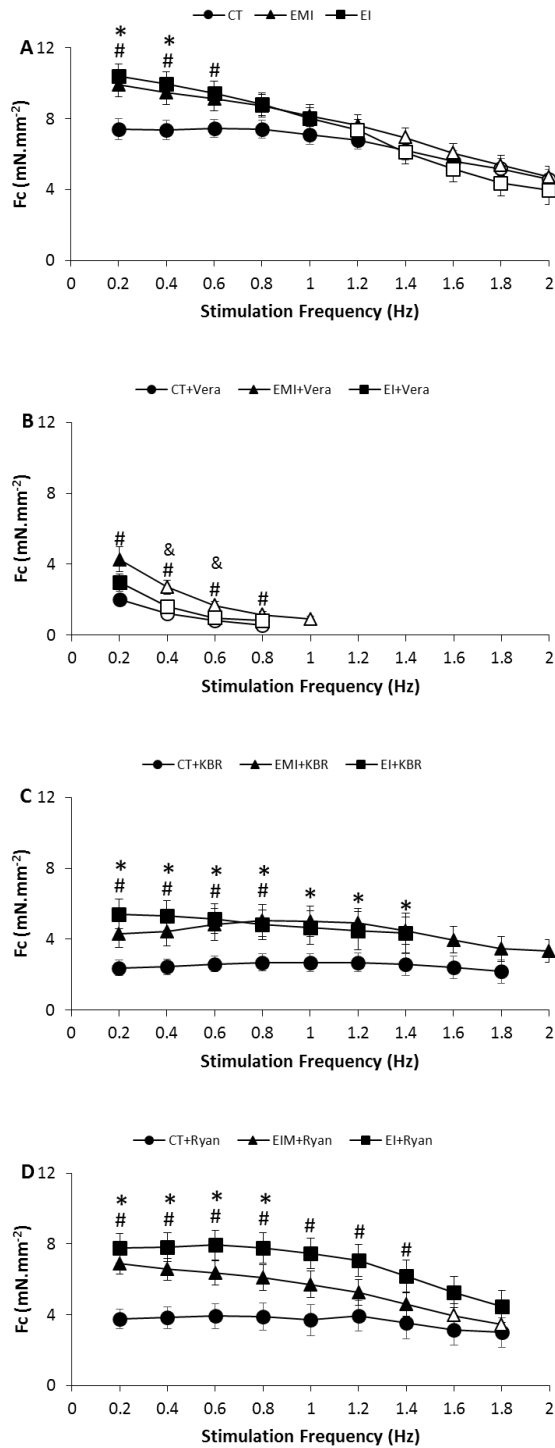
#### **4.3.1.3. Efeitos da frequência de estimulação sobre os parâmetros contráteis.**

Na Figura 21 consta a representação gráfica dos valores (média  $\pm$  E.P.M) de Fc (mN.mm<sup>-2</sup>) sob aumentos graduais na frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). A Figura 3A apresenta os valores referentes aos grupos CT, EMI e EI. Todos os grupos foram capazes de desempenhar contrações regulares até a frequência de 2,0Hz. No grupo CT o incremento na frequência de estimulação promoveu uma redução ( $P < 0,05$ ) nos valores de Fc a partir de 1,8Hz (5,1  $\pm$  0,6 mN.mm<sup>-2</sup>) em comparação ao valor encontrado para o mesmo grupo à 0,2Hz (7,4  $\pm$  0,6 mN.mm<sup>-2</sup>); nos grupos EMI e EI reduções ( $P < 0,05$ ) em relação aos seus respectivos valores apresentados à 0,2Hz (9,9  $\pm$  0,7 e 10,4  $\pm$  0,6 mN.mm<sup>-2</sup>) foi registrada a partir de 1,2Hz (7,6  $\pm$  0,6 e 7,4  $\pm$  0,6 mN.mm<sup>-2</sup>). A comparação entre os grupos mostrou que os valores de Fc apresentados por EMI foram de 30-28% maiores ( $P < 0,05$ ) em relação ao CT entre as frequências de 0,2 e 0,4Hz. Os valores apresentados por EI foram de 40-26% superiores ( $P < 0,05$ ) apenas nas frequências de 0,2 e 0,8Hz.

A Figura 21B apresenta os valores referentes aos grupos CT+Vera, EMI+Vera e EI+Vera. Os grupos CT e EI desempenharam contrações regulares até a frequência de 0,8Hz e o grupo EMI desempenhou até 1,0Hz. Em todos os grupos os valores foram inferiores ( $P < 0,05$ ) aos valores iniciais (0,2Hz) a partir de 0,4Hz. A comparação entre os grupos revelou que os valores apresentados por EMI foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos de CT em todas as frequências suportadas por CT (0,2-0,8Hz). Os valores apresentados por EI foram superiores aos de CT nas frequências de 0,4 e 0,6Hz.

A Figura 21C apresenta os valores referentes aos grupos CT+KBR, EMI+KBR e EI+KBR. O grupo CT+KBR desempenhou contrações regulares até 1,8Hz, o grupo EMI+KBR até 2,0Hz e o grupo EI+KBR até 1,4Hz. Em todos os grupos, os incrementos na frequência de estimulação não alteraram os valores de Fc. A comparação entre CT+KBR e EMI +KBR mostrou que EMI+KBR apresentou valores superiores ( $P < 0,05$ ) de Fc entre 0,2 e 0,8Hz. O grupo EI+KBR apresentou valores maiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos de CT entre as frequências de 0,2 e 1,4Hz. A Figura 21D apresenta os valores referentes aos grupos CT+Ryan, EMI+ Ryan e EI+ Ryan. Todos os grupos foram capazes de desempenhar contrações regulares até a frequência de 1,8Hz. Os incrementos de frequência promoveram decréscimos nos valores de Fc apenas no grupo EMI+Ryan a partir de 1,6Hz. O grupo CT+Ryan apresentou valores inferiores tanto aos de EMI+Ryan entre 0,2 e 0,8Hz quanto aos de EI+Ryan entre 0,2 e 1,4Hz.

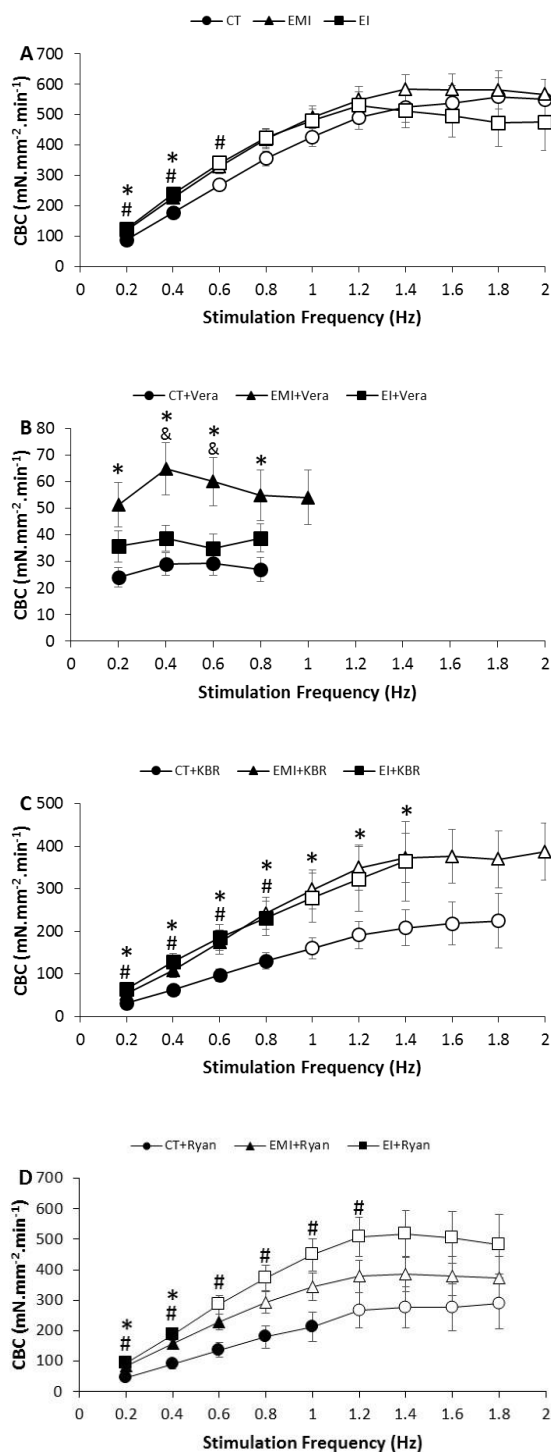
Figura 21- Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de força de contração (Fc-mN.mm<sup>-2</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=10) e Exercício intenso (EI, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painei A- comparação entre os grupos CT, EMI e EI em condição padrão. Painei B- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de verapamil (grupo+Vera). Painei C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de KBR-7493 (grupo+KBR). Painei D- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística (P < 0,05) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*) indica diferença entre CT e EMI, (#) diferença entre CT e EI, (&) diferença entre EMI e EI. Os marcadores em branco indicam diferença estatística (P < 0,05) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental.



Na Figura 22 consta a representação gráfica dos valores (média  $\pm$  E.P.M) de CBC ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ) sob aumentos graduais na frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). A Figura 5A apresenta os valores referentes aos grupos CT, EMI e EI. Todos os grupos apresentaram valores de CBC superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (apresentados à 0,2Hz) a partir de 0,4Hz. Os valores apresentados por EMI foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos de CT apenas na frequência de 0,2Hz. Ademais, a os valores apresentados por EI foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos de CT nas frequências de 0,2 e 0,4Hz (Figura 5A).

A Figura 22B apresenta os valores referentes aos grupos CT+Vera, EMI+Vera e EI+Vera. O grupo EMI+Vera apresentou valores de CBC superiores ( $P < 0,05$ ) aos de CT+Vera nas frequências de 0,2 à 0,8Hz. Adicionalmente, os valores de EMI+Vera foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos EI+Vera nas frequências de 0,4 e 0,6Hz. A Figura 22C apresenta os valores referentes aos grupos CT+KBR, EMI+KBR e EI+KBR. Todos os grupos apresentaram valores de CBC superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (apresentados à 0,2Hz) a partir de 0,8Hz. Os valores apresentados por EI+KBR foram superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos de CT+KBR entre as frequências de 0,2 e 0,6Hz. A Figura 22D apresenta os valores referentes aos grupos CT+Ryan, EMI+Ryan e EI+Ryan. Os valores de CBC foram superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (apresentados à 0,2Hz) a partir de 1,0Hz no grupo CT+Ryan, de 0,6Hz no grupo EMI+Ryan e de 0,4Hz no grupo EI+Ryan. A comparação entre os grupos revelou que os valores apresentados por EMI+Ryan foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos de CT+Ryan na frequências de 0,2 e 0,4Hz. Ademais, EI+Ryan apresentou valores superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos de CT+Ryan em todas as frequências entre 0,2 e 1,2Hz.

Figura 22- Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC- $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ) dos grupos Controle (CT,  $n=10$ ) Exercício moderadamente intenso (EMI,  $n=10$ ) e Exercício intenso (EI,  $n=10$ ) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Paine A- comparação entre os grupos CT, EMI e EI em condição padrão. Paine B- comparação entre os grupos sob o tratamento com  $10\ \mu\text{M}$  de verapamil (grupo+Vera). Paine C- comparação entre os grupos sob o tratamento com  $10\ \mu\text{M}$  de KBR-7493 (grupo+KBR). Paine D- comparação entre os grupos sob o tratamento com  $10\ \mu\text{M}$  de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*) indica diferença entre CT e EMI, (#) diferença entre CT e EI, (&) diferença entre EMI e EI. Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental.



A Figura 23 apresenta a comparação entre os valores obtidos para os grupos CT, EMI ou EI após o bloqueio farmacológico dos LTCCs (10  $\mu$ M de verapamil) e do modo reverso do NCX (10  $\mu$ M de KB-R7493) e da inibição funcional do RS (10  $\mu$ M de rianodina). A comparação estatística entre os diferentes tratamentos farmacológicos no grupo CT consta na Figura 23A. O bloqueio dos LTCCs causou uma redução de 72 à 92% ( $P < 0,05$ ) nos valores de Fc no grupo CT em toda a faixa de frequência suportada pelo grupo (Figura 23A). O bloqueio do modo reverso do NCX também promoveu decréscimo de 68% (0,2Hz) à 58% (1,8Hz) nos valores de Fc ( $P < 0,05$ ) em todas as frequências suportadas por este grupo. Ademais, a inibição funcional do RS causou reduções de 49%(0,2Hz) à 42% (1,8Hz) na Fc ( $P < 0,05$ ) todas as frequências. O bloqueio dos LTCCs acarretou em reduções 46% (0,2Hz) à 85% (1,8Hz) ( $P < 0,05$ ) em relação aos valores aos apresentados pelo grupos sob a inibição do RS.

A comparação estatística entre os diferentes tratamentos farmacológicos no grupo EMI consta na Figura 23B. Os valores de Fc apresentados pelo grupo EMI+Vera foram de 57% (0,2Hz) à 90% (1,0Hz) inferiores ( $P < 0,05$ ) em comparação com EMI em todas as frequências suportadas por EMI+Vera. A comparação entre EMI e EMI+KBR revelou que os valores de EMI+KBR foram de 56% (0,2Hz) à 35% (1,6Hz) inferiores ( $P < 0,05$ ). Os valores de EMI+Ryan foram de 30%(0,2Hz) à 33%(1,4Hz) inferiores ( $P < 0,05$ ) em comparação ao grupo EMI em todas as frequências. Os valores apresentados por EMI+KBR foram de 65% (0,6Hz) à 82% (1,0Hz) superiores ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo EMI+Vera. O grupo EMI+Ryan apresentou valores de 37% (0,4Hz) à 84% (1,0Hz) superiores ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo EMI+Vera. Ademais, EMI+Ryan apresentou valores superiores ( $P < 0,05$ ) aos de EMI+KBR entre 0,2 e 0,4Hz.

A comparação estatística entre os diferentes tratamentos farmacológicos no grupo EI consta na Figura 23C. Os valores de Fc apresentados pelo grupo EI+Vera foram de 71%(0,2Hz) à 90%(0,8Hz) inferiores ( $P < 0,05$ ) em comparação com EI em todas as frequências suportadas por EI+Vera. A comparação entre EI e EI+KBR revelou que os valores de EI+KBR foram de

47%(0,2Hz) à 28% (1,2Hz) inferiores ( $P < 0,05$ ). Os valores de EI+Ryan foram de 25%(0,2Hz) à 21%(0,4Hz) inferiores ( $P < 0,05$ ) em comparação ao grupo EI. Os valores apresentados por EI+KBR foram de 46% (0,2Hz) à 83% (0,8Hz) superiores ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo EI+Vera. O grupo EI+Ryan apresentou valores de 61% (0,4Hz) à 89% (0,8Hz) superiores ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo EI+Vera. Ademais, EI+Ryan apresentou valores superiores ( $P < 0,05$ ) aos de EI+KBR entre 0,6 e 0,8Hz.



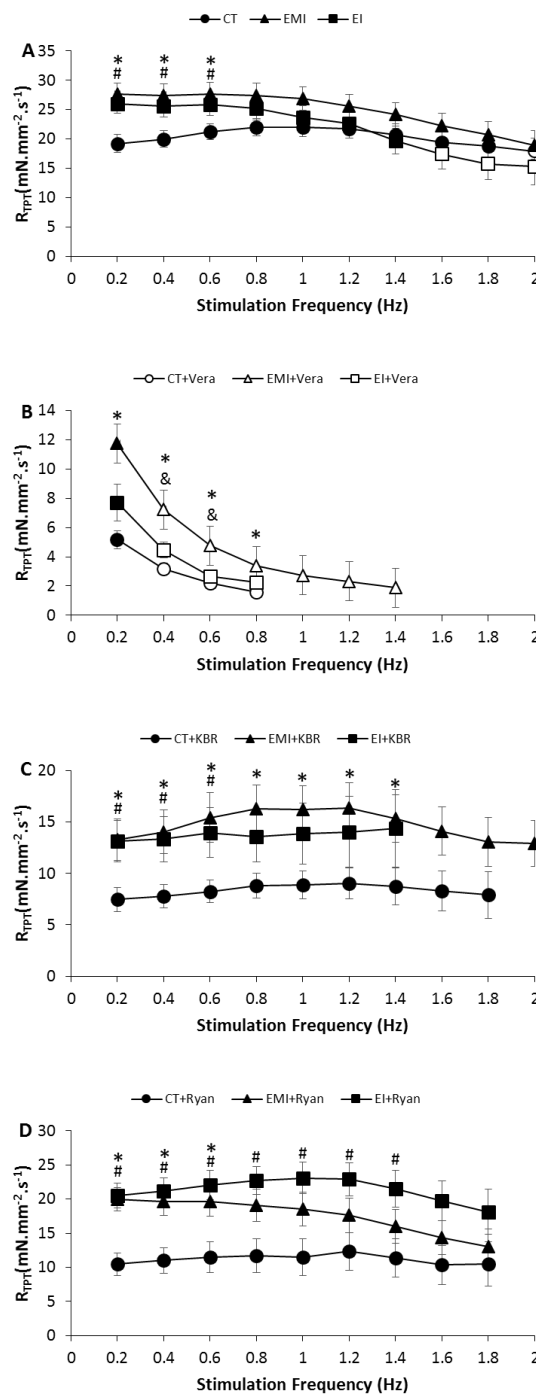


Na Figura 24 consta a representação gráfica dos valores (média  $\pm$  E.P.M) de  $R_{TPT}$  ( $Fc.TPT^{-1} - mN.mm^{-2}.s^{-1}$ ) sob aumentos graduais na frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). A Figura 24A apresenta os valores referentes aos grupos CT, EMI e EI. Os valores apresentados pelo grupo EI foram inferiores ( $P < 0,05$ ) em comparação aos apresentados na frequência inicial de 0,2Hz nas frequências entre 1,6 e 2Hz. A comparação entre os grupos mostrou que os valores apresentados por CT foram inferiores em relação aos de EMI nas frequências entre 0,2 e 0,6Hz. O grupos EI apresentou um valor superior ao de CT apenas na frequência de 0,2Hz.

A Figura 24B apresenta os valores referentes aos grupos CT+Vera, EMI+Vera e EI+Vera. Os valores apresentados pelo grupo CT+Vera foram inferiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais (obtidos à 0,2Hz) entre 0,4 e 0,8Hz. Todos os valores apresentados pelo grupo EMI+Vera frente aos incrementos de frequência (0,4-1,4Hz) foram inferiores ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor inicial deste grupo obtido à 0,2Hz. Ademais, os valores apresentados por EI+Vera foram inferiores em relação aos valores iniciais entre 0,4 e 0,8Hz. A comparação entre os grupos CT+Vera e EMI+Vera mostrou que os valores de EMI+Vera foram superiores entre as frequências entre 0,2 e 0,8Hz. A comparação entre EMI e EI mostrou que o grupo EMI também apresentou valores superiores ( $P < 0,05$ ) nas frequências de 0,4 e 0,6Hz. A Figura 24C apresenta os valores referentes aos grupos CT+KBR, EMI+KBR e EI+KBR. Os valores apresentados pelos grupos não variaram frente à aumentos na frequência de estimulação. A comparação entre os grupos CT+KBR e EMI+KBR mostrou que os valores apresentados pelo grupo EMI+KBR foram superiores ( $P < 0,05$ ) entre 0,2 e 1,0Hz. Ademais, a comparação entre CT+KBR e EI+KBR revelou que os valores de EI+KBR foram superiores entre 0,2 e 0,4Hz. A Figura 24D apresenta os valores referentes aos grupos CT+Ryan, EMI+Ryan e EI+Ryan. Os valores apresentados pelos grupos não variaram frente à aumentos na frequência de estimulação. A comparação entre os grupos CT+Ryan e EMI+Ryan revelou que os valores de EMI+Ryan foram superiores entre as frequências de 0,2 e 0,6Hz. Ademais, a comparação entre

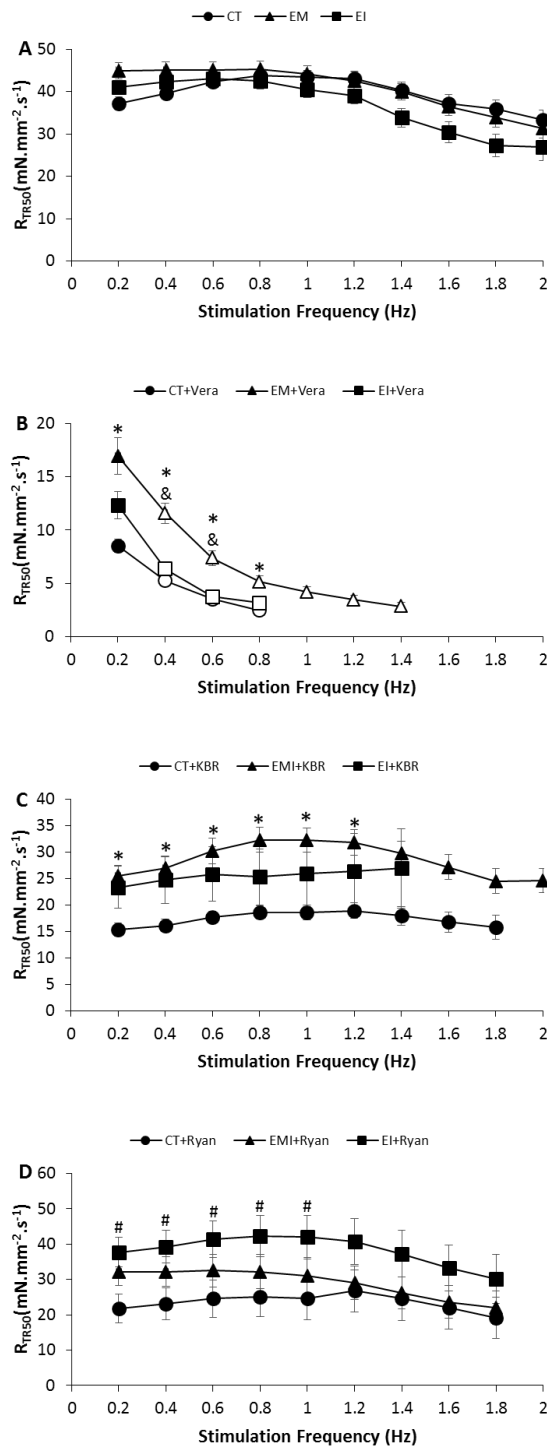
os grupos CT+Ryan e EI+Ryan revelou que os valores de EI+Ryan foram superiores entre as frequências de 0,2 e 1,4Hz.

Figura 24- Comparação entre os valores (média  $\pm$  E.P.M) da taxa para pico de tensão ( $R_{TPT}$ -mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=10) e Exercício intenso (EI, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painel A- comparação entre os grupos CT, EMI e EI em condição padrão. Painel B- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de verapamil (grupo+Vera). Painel C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de KBR-7493 (grupo+KBR). Painel D- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10  $\mu$ M de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*) indica diferença entre CT e EMI, (#) diferença entre CT e EI, (&) diferença entre EMI e EI. Os marcadores em branco indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental.



Na Figura 25 consta a representação gráfica dos valores (média  $\pm$  E.P.M) de  $R_{TR50}$  ( $F_c \cdot TR50^{-1} - mN \cdot mm^{-2} \cdot s^{-1}$ ) sob aumentos graduais na frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). A Figura 25A apresenta os valores referentes aos grupos CT, EMI e EI. A Figura 25A apresenta os valores referentes aos grupos CT, EMI e EI, não houve diferença significativa entre os valores apresentados pelos grupos frente aos incrementos de frequência. Ademais, a comparação entre os diferentes grupos não revelou diferença significativa ( $P > 0,05$ ). A Figura 25B apresenta os valores referentes aos grupos CT+Vera, EMI+Vera e EI+Vera. Todos os valores apresentados pelos grupos CT+Vera, EMI+Vera, EI+Vera foram inferiores ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor inicial deste grupo obtido à 0,2Hz. Os valores apresentados pelo grupo CT+Vera foram inferiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos de EMI+Vera entre 0,2 e 0,8Hz. A comparação entre os grupos EMI+Vera e EI+Vera mostrou que os valores de EI+Vera foram inferiores ( $P < 0,05$ ) nas frequências de 0,4 e 0,6Hz. A Figura 25C A apresenta os valores referentes aos grupos CT+KBR, EMI+KBR e EI+KBR. Os valores apresentados pelos grupos não variaram frente à aumentos na frequência de estimulação. A comparação entre os grupos não revelou diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ). A Figura 25D apresenta os valores referentes aos grupos CT+Ryan, EMI+Ryan e EI+Ryan. Os valores apresentados pelos grupos não variaram frente à aumentos na frequência de estimulação. Os valores apresentados pelo grupo CT+Ryan foram inferiores ( $P < 0,05$ ) em comparação aos de EI+Ryan entre as frequências de 0,2 e 0,6Hz.

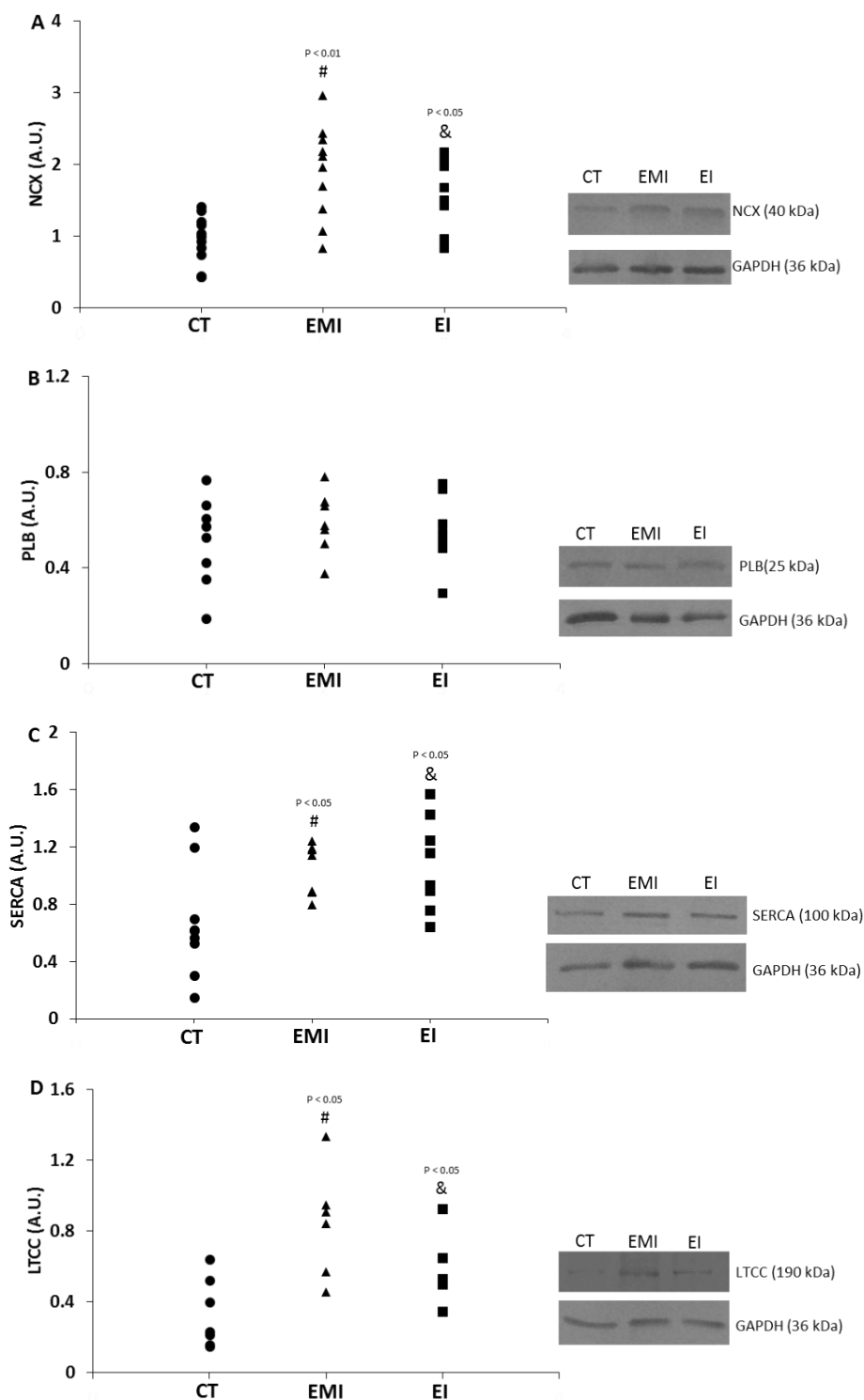
Figura 25- Comparação entre os valores (média ± E.P.M) da taxa para 50% de relaxamento ( $R_{TR50}$ -mN.mm<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (CT, n=10) Exercício moderadamente intenso (EMI, n=10) e Exercício intenso (EI, n=10) durante aumentos graduais da frequência de estimulação (0,2-2,0Hz). Painel A- comparação entre os grupos CT, EMI e EI em condição padrão. Painel B- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10 μM de verapamil (grupo+Vera). Painel C- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10 μM de KBR-7493 (grupo+KBR). Painel D- comparação entre os grupos sob o tratamento com 10 μM de Rianodina (grupo+Ryan). Símbolos indicam diferença estatística (P < 0,05) entre diferentes grupos experimentais na mesma frequência de estimulação, (\*) indica diferença entre CT e EMI, (#) diferença entre CT e EI, (&) diferença entre EMI e EI. Os marcadores em branco indicam diferença estatística (P < 0,05) em relação ao valor apresentado sob a frequência de 0,2Hz no mesmo grupo experimental.



#### 4.3.1.4. Expressão de NCX, PLB, SERCA2 e LTCCs

A comparação entre valores de em unidades arbitrárias (U.A.) referentes à expressão do NCX, PLB, SERCA2 e LTCC, normalizados pelos valores de GAPDH, obtidos para os grupos CT, EMI e EI consta na Figura 26, a expressão de cada banda está representada em pontos univariados. A média dos valores de expressão de NCX apresentados pelo grupo EMI ( $1,9 \pm 0,2$  U.A) e EI ( $1,5 \pm 0,15$  U.A) foram superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos valores apresentados pelo grupo CT ( $0,9 \pm 0,1$  U.A) (Figura 26A). Os valores de expressão de PLB apresentados pelo grupo EMI ( $0,6 \pm 0,04$  U.A) e EI ( $0,58 \pm 0,05$  U.A) não variaram em relação aos valores apresentados pelo grupo CT ( $0,47 \pm 0,07$  U.A) (Figura 26B). A média dos valores de expressão de SERCA2 apresentados pelo grupo EMI ( $1,02 \pm 0,06$  U.A) e EI ( $1,07 \pm 0,11$  U.A) foram superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos valores apresentados pelo grupo CT ( $0,64 \pm 0,1$  U.A) (Figura 26C). Ademais, a média dos valores de expressão de LTCC apresentados pelo grupo EMI ( $0,84 \pm 0,12$  U.A) e EI ( $0,52 \pm 0,09$  U.A) foram superiores ( $P < 0,05$ ) em relação aos valores apresentados pelo grupo CT ( $0,33 \pm 0,07$  U.A) (Figura 26D).

Figura 26- Comparação entre os valores médios das taxas de expressão do NCX, PLB e SERCA2 e LTCCs de tecido ventricular de *B. amazonicus* (n=6) dos grupos CT, EMI e EI. Valores são apresentados em unidades arbitrárias (U.A.  $\pm$  E.P.M) calculadas a partir da normalização das densidades ópticas obtidas para as proteínas analisadas em função dos valores de densidade de GAPDH das respectivas amostras. **A-** comparação entre as taxas de expressão do NCX. **B-** comparação entre as taxas de expressão do PLB. **C-** comparação entre as taxas de expressão da SERCA2. **D-** comparação entre as taxas de expressão dos LTCCs (#) indica diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os diferentes grupos CT e EMI. (&) indica diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os diferentes grupos CT e EI.



### 4.3.2. Discussão

Diversos trabalhos mostraram que a exposição à intensidades moderadas de exercício contínuo melhoram o crescimento e conversão alimentar principalmente em espécies de peixe ativas (DAVISON, 1997). De forma semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho, a manutenção de salmonídeos em nado sustentado em velocidades entre 0,8-1,5 CC.s<sup>-1</sup> promoveu aumentos de 20 à 40% nas taxas de crescimento (BROWN et al., 2011; JOBLING et al., 1993). Ademais, diversos trabalhos mostraram que o matrinxã apresentou crescimento de 17 à 38% superiores quando mantidos (60-90 dias) em nado contínuo entre as velocidades de 1-1,5 CC.s<sup>-1</sup> em comparação com animais sedentários (ARBELÁEZ-ROJAS; INOUE; MORAES, 2011; ARBELÁEZ-ROJAS; MORAES, 2010; HACKBARTH; MORAES, 2006), embora tais trabalhos tenham empregado diferentes temperaturas (24-30°C), quantidades e teores proteicos da ração oferecida.

Os resultados obtidos indicam que nas velocidades analisadas no presente estudo (0,8 e 1,4 CC.s<sup>-1</sup>) houve uma interação diretamente proporcional entre o ganho de massa dos indivíduos de *B. amazonicus* e a velocidade da corrente a qual foram submetidos. Portanto, em conjunto com os estudos citados para matrinxã, os resultados obtidos indicam uma interação sinérgica entre a taxa de crescimento e a velocidade de natação a qual os animais foram submetidos. Uma relação inversa foi apresentada por espécies menos ativas como peixinho-dourado (*Carassius auratus*) e o “chub” (*Leuciscus cephalus*) que reduziram suas taxas de crescimento quando submetidos de forma extensiva às correntes de 1,5 e 1,7 CC.s<sup>-1</sup> respectivamente, indicando que o gasto energético despendido na natação comprometeu o ganho de massa (DAVISON; GOLDSPINK, 1978; SANGER, 1992).

A habilidade que algumas espécies de peixe possuem de crescerem quando submetidas ao exercício de longa duração pode indicar que elas são capazes de equilibrar os gastos energéticos adicionais com facilidade, desempenhando respostas comportamentais ou fisiológicas mais eficientes em resposta ao exercício (BROWN et al., 2011). Em conformidade,

salmonídeos apresentam a capacidade manter o fluxo sanguíneo intestinal durante o exercício através de elevações no débito cardíaco, volume sistólico, frequência cardíaca ( $f_H$ ) e na pressão arterial, ainda que apresentando reduções no desempenho natatório (FARRELL et al., 2001).

Ademais, espécies de peixe atléticas tendem a apresentar ventrículos maiores e potencialmente mais capazes de gerar níveis mais elevados de pressão arterial, apresentando, portanto, valores maiores de MVR (VORNANEN, 2011). Apesar de espécies muito ativas de atuns apresentarem valores de MVR podendo chegar à 0,4%, a maioria das espécies de peixe apresenta valores em torno de 0,1% (FARRELL et al., 1988; GAMPERL; FARRELL, 2004; VORNANEN, 2011), semelhantes aos encontrados no presente estudo para matrinxã (~0,08%). De forma semelhante, estudos que expuseram truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) à treinamentos de exercício extensivo (14-52 dias) de ~2 CC.s<sup>-1</sup> de intensidade presenciaram maiores taxas de crescimento corporal, mas também não encontraram alterações na MVR (DINDIA; ALDERMAN; GILLIS, 2017; FARRELL et al., 1990).

O protocolo experimental que avaliou o efeito do exercício prolongado de baixa intensidade (EM - 60 dias à 0,4 CC.s<sup>-1</sup>) também mostrou taxas de crescimento corporal aumentadas, mas a manutenção de valores constantes de MVR em relação à animais sedentários (RISSOLI et al., 2017). No presente protocolo, os valores de MVR foram inferiores apenas no grupo EMI em comparação aos de CT, indicando que a intensidade do exercício induziu distinções na proporção entre as taxas crescimento somático e ventricular. Apesar desta redução nos valores de MVR encontradas em EMI, os valores de MVR dos CT e EI se mostraram equivalentes, indicando que esta intensidade de exercício promoveu taxas de crescimento ventricular isométricas em relação ao comprimento corporal.

O crescimento cardíaco em truta arco-íris (*O. mykiss*) é caracterizado por uma mistura entre hipertrofia (aumento no volume) e hiperplasia (aumento no número de células) do miocárdio, o que difere do padrão de crescimento predominantemente hipertrófico apresentado por mamíferos adultos (CLARK; RODNICK, 1998; FARRELL et al., 1988). Entretanto, a



arquitetura dos cardiomiócitos de peixe limita a hipertrofia uma vez que, na ausência de túbulos T, um aumento na espessura celular acarreta em uma elevação na distância difusional que pode prejudicar a distribuição celular de  $O_2$  e  $Ca^{2+}$  durante as contrações (CLARK; RODNICK, 1998). Desta forma, estudos indicam que a hiperplasia é a principal responsável pelo crescimento cardíaco em peixes, embora a hipertrofia também seja presenciada frequentemente (FARRELL et al., 1988). Entretanto, o fato dos valores de MVR não terem aumentado significativamente nos grupos EMI e EI em relação ao grupo ao CT mostra que o exercício aeróbico prolongado não promoveu hipertrofia ventricular na espécie estudada.

Os dados obtidos pela análise dos parâmetros contráteis *in vitro* dos grupos CT, EMI e EI revelaram que todos os grupos apresentaram uma relação força-frequência negativa em relação ao valores iniciais apresentados em 0,2Hz. Entretanto, ambos os grupos exercitados sofreram decréscimos na Fc a partir de 1,0Hz (60 bpm) enquanto que o grupo CT apresentou reduções apenas a partir de 1,6Hz (96 bpm). Tais resultados diferem dos encontrados para o grupo EM, cuja Fc sofreu decréscimos a partir 1,6Hz. Sob o bloqueio farmacológico dos LTCCs, os decréscimos nos valores de Fc frente aos incrementos de frequência em todos os grupos era um resultado previsível e expõe o papel essencial destes canais para a manutenção da tensão durante aumentos na  $f_H$ .

O bloqueio farmacológico do NCX em modo reverso não provocou decréscimos na Fc frente à aumentos de frequência em nenhum dos grupos, indicando que os LTCCs em conjunto com o estoque de  $Ca^{2+}$  do RS foram capazes de manter os valores de Fc constantes mesmo em frequências elevadas. Ademais, com a inibição funcional do RS, apenas o grupo EMI apresentou decréscimos de Fc a partir de 1,4Hz, indicando que os LTCCs e o modo reverso do NCX também podem manter um influxo de  $Ca^{2+}$  adequando para a geração de tensão em frequências altas.

A comparação entre os grupos mostrou que os valores de Fc de EMI e EI foram superiores apenas entre 0,2 e 0,6Hz, uma faixa de frequências inferior à frequência basal *in vivo*

(~1,1Hz) descrita para matrinxã em normoxia (MONTEIRO et al., 2013). Tal resultado também contrasta com os encontrados para os strips ventriculares do grupo EM, que apresentaram valores superiores de Fc e CBC entre 0,2 e 1,4Hz em comparação com animais sedentários. Sob o bloqueio dos LTCCs, o grupo EMI apresentou uma maior capacidade de geração de tensão em comparação tanto com EI quanto com CT, indicando que a intensidade de exercício aplicada neste grupo induziu participações aumentadas do RS e modo reverso do NCX em relação aos demais grupos.

Entretanto, após o bloqueio do modo reverso do NCX, o grupo EMI apresentou valores superiores de Fc e CBC em uma ampla faixa de frequências (0,2-1,4Hz), indicando que os maiores valores de tensão decorreram da participação do RS. O grupo EI apresentou valores mais elevados de Fc e CBC em relação ao grupo CT em uma faixa mais restrita de frequências (0,2-0,8Hz), indicando que neste grupo o influxo de  $Ca^{2+}$  via NCX assumiu maior relevância em frequências mais elevadas. Após inibição funcional do RS, tanto o grupo EI quanto EMI apresentaram valores de Fc e CBC superiores em relação ao CT, entretanto, o grupo EI os valores mais elevados foram mantidos em uma faixa de frequências mais ampla (0,2-1,4Hz) em relação à EMI (0,2-1,0Hz). Tal resultado indica que o grupo EI apresentou uma diminuição na dependência do RS como doador de  $Ca^{2+}$  em relação ao grupo EMI, sendo capaz de desempenhar contrações regulares em frequências elevadas mesmo sem a participação do RS.

A comparação entre os decréscimo dos valores de Fc apresentados por cada grupo após a inibição dos LTCCs, do modo reverso do NCX e do RS também podem reforçar a presença de modulações distintas no papel relativo de cada componente em resposta aos diferentes protocolos de exercício. No grupo CT, o bloqueio dos LTCCs promoveu decréscimos gradativos nos valores de Fc de 72 à 92% em conformidade com a frequência de estimulação, confirmando o papel essencial destes canais para o influxo de  $Ca^{2+}$  que poderá atuar tanto diretamente nos miofilamentos quanto na CICR. Tanto o bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$  pelo NCX quando a inibição funcional do RS causaram reduções equivalentes de ~50% em todas as

frequências de estimulação indicando que, em condições CT, pode haver uma interação entre a fração de influxo  $\text{Ca}^{2+}$  via NCX e o estoque do RS.

Trabalhos com miócitos de musculatura lisa (HIROTA; PERTENS; JANSSEN, 2007) e ventricular (HUANG; HOVE-MADSEN; TIBBITS, 2007) de mamíferos revelaram que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via NCX se mostrou importante para o reabastecimento do RS. Desta forma, pode-se propor que a inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via NCX tenha comprometido o reabastecimento do RS, gerando um decréscimo equivalente nos valores de Fc nas tiras ventriculares do grupo CT. Ademais, as tiras ventriculares do grupo CT para o grupo EM também sofreram decréscimos de ~50% no valores de Fc em uma ampla faixa de frequência de estimulação após o tratamento de com rianodina, reforçando a elevada participação do RS nessa espécie.

No grupo EMI, o bloqueio dos LTCCs promoveu reduções de 56 à 90%, também revelando o papel essencial destes canais para o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e para a CICR. Entretanto, o bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via NCX causou reduções de 56% (0,2Hz) à 35% (1,6Hz) na Fc enquanto que a inibição do RS promoveu um decréscimo de ~30% em todas as frequências. Tais resultados indicam que em EMI o  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do NCX pode, além de promover o reabastecimento do RS, ter atuado para a contração em frequências baixas. No grupo EI, o bloqueio dos LTCCs também ocasionou decréscimos de 71 à 90% na capacidade de geração de força contrátil, o que revela o protagonismo destes canais para geração de força. Já o bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via NCX acarretou em reduções na Fc de 47 à 28%. Entretanto, no grupo EI a inibição funcional do RS promoveu uma redução na Fc de ~20% apenas nas frequências subfisiológicas de 0,2 e 0,4Hz, indicando uma aparente independência do RS para a geração de força em frequências mais elevadas. Desta forma, os resultados indicam que no grupo EI o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via NCX assumiu uma maior relevância para a ativação dos miofilamentos.

A análise dos valores de  $R_{TPT}$  mostrou que o grupos EI e EMI apresentaram contrações mais rápidas em relação ao grupos CT entre as frequências de 0,2 à 0,6Hz, indicando que os

grupos exercitados também apresentaram elevações na dinâmica contrátil em frequências baixas. Sob bloqueio farmacológico dos LTCCs, o grupo EMI apresentou valores mais elevados de  $R_{TPT}$  em relação aos grupos EI (0,4-0,6Hz) e CT (0,2-0,8Hz), o mesmo padrão rescrito na análise da Fc e CBC, o que corrobora a hipótese de uma maior participação do NCX e RS na geração de força neste grupo. Ademais, os valores apresentados pelo grupo EMI também foram superiores em relação aos de CT após o bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$  via NCX. Após a inibição do RS, o grupo EI apresentou valores de  $R_{TPT}$  superiores de em relação à CT entre 0,2 e 1,4Hz, enquanto que o grupo EMI apresentou valores superiores apenas entre as frequências de 0,2 e 0,6Hz. Tais resultados também corroboram uma menor participação do RS para a dinâmica contrátil do grupo EI.

Os valores de dinâmica de relaxamento ( $R_{TR50}$ ) não diferiram entre os grupos e não sofreram alterações em nenhuma das frequências analisadas. Os indivíduos do grupo EM também apresentaram valores de  $R_{TR50}$  constantes ( $\sim 39 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) mesmo frente à incrementos de frequência, um padrão idêntico ao obtido para os grupos CT ( $\sim 39,6 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), EMI ( $\sim 41 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e EI ( $\sim 37 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Tal padrão corrobora a hipótese de que os miócitos de *B. amazonicus* mantém valores constantes de  $R_{TR50}$  independentemente da frequência de estimulação. Além disso, a manutenção de valores similares de  $R_{TR50}$  entre os diferentes grupos indica que dinâmica de relaxamento dos miócitos se manteve em uma faixa ótima independente da intensidade de exercício a que os animais foram submetidos.

Com o bloqueio dos LTCCs, o grupo EMI também apresentou valores mais elevados de  $R_{TR50}$  tanto em relação ao grupo CT (0,2-0,8Hz) quanto EI (0,4-0,6Hz). Portanto, em EMI a dinâmica de relaxamento se manteve mais elevada em relação aos demais grupos mesmo com o influxo reduzido de  $Ca^{2+}$  pela sarcolema, indicando uma maior capacidade de retirada de  $Ca^{2+}$  do NCX e/ou do RS. Esta maior dinâmica de relaxamento no grupo EMI também foi mantida

em comparação ao CT após o bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via NCX, o que não foi constatado para o grupo EI.

Em conjunto com a análise da  $R_{TPT}$  do grupo EMI tanto sob o bloqueio dos LTCCs quanto do modo reverso de NCX, este grupo apresentou uma relevância aumentada do RS tanto para contração quanto para o relaxamento. Sob a inibição do RS, os valores de  $R_{TR50}$  não diferiram entre EMI e CT enquanto que o grupo EI apresentou valores superiores (0,2-1,0Hz) em relação à CT. Tais resultados reforçam a maior dependência do RS para o relaxamento nos grupos CT e EMI e a redução da participação desta organela no grupo EI. O conjunto de resultados obtido para o grupo EMI indica uma manutenção na relevância do RS para a contração e o relaxamento principalmente em frequências de estimulação elevadas, uma resposta semelhante à encontrada para o grupo EM.

Em miócitos de peixes, que apresentam uma grande razão superfície volume, a distância difusional da liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  do RS é equivalente à da tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  via SL, não representando uma vantagem cinética sobre o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pela SL (VORNANEN; SHIELS; FARRELL, 2002). No entanto, em miócitos que apresentam maiores volumes como os de mamíferos, a utilização do RS se torna vantajosa por reduzir a distância difusional do  $\text{Ca}^{2+}$  durante as contrações e relaxamentos (SHIELS; GALLI, 2014). Já a retirada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS pode ser considerada mais eficiente energeticamente em relação ao NCX, uma vez que a SERCA2 transporta duas moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante a hidrólise de uma molécula de ATP, enquanto que a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  via NCX (troca de  $3\text{Na}^+$  para cada  $1\text{Ca}^{2+}$ ) necessita da hidrólise de uma molécula de ATP pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase para a geração do gradiente de  $\text{Na}^+$  necessário para a extrusão de apenas uma molécula de  $\text{Ca}^{2+}$  (VORNANEN; SHIELS; FARRELL, 2002).

Estudos apontam que em peixes o RS seja uma fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  adicional, complementando o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via SL e, dessa forma, auxiliando na manutenção de frequências cardíacas mais elevadas e maiores dinâmicas de contração (SHIELS et al., 1999; SHIELS; FARRELL, 2000). Desta forma, entende-se que a presença de um ciclo de  $\text{Ca}^{2+}$  *via*

RS assume maior relevância em espécies de peixe ativas, por apresentarem maiores demandas cardíacas (SHIELS; GALLI, 2014). Tal papel complementar foi corroborado pelos resultados obtidos no presente trabalho, onde o bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via LTCCs acarretou reduções superiores à 70% nos parâmetros contráteis em todos os grupos, enquanto a inibição funcional do RS causou reduções na capacidade de geração de força de 50% no grupo CT e 30% no grupo EMI. Entretanto, os resultados obtidos para o grupo EI diferem dos demais grupos uma vez que a inibição funcional do RS não acarretou reduções na produção de força na maioria das frequências de estimulação.

Relevante para o presente trabalho é que DINDIA; ALDERMAN; GILLIS (2017) descreveram que a exposição de truta arco-íris ao exercício aeróbico contínuo (1,7  $\text{CC}\cdot\text{s}^{-1}$  por 4, 7 e 14 dias) desencadeou aumentos expressivos nas abundâncias de proteínas contráteis e relacionadas à integridade celular após 4 dias de exposição. Entretanto, quando a exposição ao exercício se estendeu para 14 dias, os autores descreveram uma redução na abundância de proteínas ligadas às vias de produção de energia como a glicólise,  $\beta$ -oxidação e na cadeia transportadora de elétrons, indicando uma redução no investimento na manutenção de tais processos. Apesar do matrinxã apresentar um miocárdio compacto dotado de circulação coronariana (THOMAZ, 2011), assim como a truta arco-íris (EKSTRÖM et al., 2017), o padrão circulatório de teleosteos no qual o sangue retorna ao coração somente após atravessar a circulação sistêmica pode favorecer um déficit de  $\text{O}_2$  no miocárdio durante exercício (STEFFENSEN; FARRELL; FARRELL, 1998).

Como descrito, o grupo EI apresentou uma maior taxa de crescimento em relação ao EMI, mesmo sob a exposição constante à uma intensidade maior de corrente ( $\sim 1,40 \text{ CC}\cdot\text{s}^{-1}$ ). O crescimento e exercício impostos, necessariamente, demandam um maior consumo de  $\text{O}_2$  pela musculatura esquelética o que pode limitar o suprimento de  $\text{O}_2$  para o coração e, portanto, a capacidade de produção de ATP neste tecido (FARRELL, 2011; MCKENZIE, 2011). Dessa forma, a diminuição da participação do RS como doador de  $\text{Ca}^{2+}$  e elevação dos componentes

sarcolemais apresentada por EI pode indicar uma adaptação frente ao menor suprimento de O<sub>2</sub> no miocárdio ventricular. Apesar da SERCA2 promover uma retirada mais eficiente de Ca<sup>2+</sup> em relação ao NCX, o potencial de membrana gerado pela atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase é primordial para a manutenção de todo o processo contrátil, sendo, presumivelmente, mais importante que a manutenção do RS durante a ciclagem de Ca<sup>2+</sup>. Neste sentido, enquanto o acúmulo de Ca<sup>2+</sup> no RS é mantido pela hidrólise constante de ATP, tanto o influxo quanto a extrusão de Ca<sup>2+</sup> através dos componentes sarcolemais (que operam via o gradiente iônico gerado pela NKA) não demandam gastos energéticos adicionais. Desta forma, perante os resultados obtidos no presente trabalho para o grupo EI, pode-se sugerir que a perda de relevância do RS como doador de Ca<sup>2+</sup> e priorização dos LTCCs e do NCX seja uma resposta cardíaca frente ao exercício extensivo de maior intensidade. Assim, apesar de existir uma correlação entre a maior atuação do RS no ciclo de Ca<sup>2+</sup> ventricular de espécies de peixe atléticas (AHO; VORNANEN, 1999; IMBERT-AUVRAY et al., 2013; KEEN et al., 1992; RIVAROLI; RANTIN; KALININ, 2006; SHIELS et al., 1999), os resultados obtidos no presente trabalho indicam que uma espécie de peixe ativa, com RS funcional nas contrações ventriculares, por apresentar uma redução na participação do RS em resposta ao treinamento de exercício prolongado.

A análise da expressão dos componentes envolvidos no acoplamento E-C mostrou que os grupos exercitados apresentaram elevações nas taxas de expressão dos LTCCs, do NCX e da SERCA2 em relação ao grupo CT, também indicando o desenvolvimento de modulação cardíaca após o treinamento de exercício. A maior expressão dos LTCCs e NCX nos grupos treinados reflete o papel essencial destes componentes nas modulações cardíacas em resposta ao exercício. No grupo EMI, a maior taxa de expressão da SERCA2 corrobora a maior participação do RS como fornecedor de Ca<sup>2+</sup>, o que foi evidenciado pelos resultados *in vitro* deste grupo. Entretanto, o grupo EI também apresentou taxas de expressão de SERCA2 mais elevadas em relação ao grupo CT, embora os resultados *in vitro* tenham indicado uma marcante

redução do papel RS na ciclagem de  $\text{Ca}^{2+}$ . Uma explicação possível para tal aumento na expressão é que o tecido ventricular do grupo EI tenha apresentado uma hiperplasia e, portanto, aumentado o número de miócitos no miocárdio. Tal hiperplasia pode ter favorecido o estabelecimento de células delgadas que apresentam RS menores bem como menores quantidades de SERCA2. Tal padrão poderia elevar os taxas totais de expressão da SERCA2 no miocárdio, embora a expressão por célula possa ter diminuído. Os resultados *in vitro* para o grupo EI suportam essa hipótese, uma vez que o desenvolvimento de um maior número de células dotadas de uma maior razão superfície/volume propiciaria a atuação dos componentes da SL durante a ciclagem do  $\text{Ca}^{2+}$ .

As taxas de expressão do PLB nos grupos EMI e EI não diferiram entre si e em relação ao CT. Já os peixes do grupo EM apresentaram uma elevação nas taxas de expressão do PLB e redução nas taxas de expressão da SERCA2. Uma vez que maiores taxas PLB/SERCA2 são frequentemente associadas à diminuições na afinidade da SERCA2 pelo  $\text{Ca}^{2+}$  em mamíferos (HAGHIGHI et al., 2003), os resultados obtidos para EM podem indicar uma adaptação na atividade da SERCA2 frente aos níveis mais elevadas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em matrinxã. Portanto, uma vez que papéis relativos distintos do RS foram encontrados em EMI e EI, pode-se sugerir que outros processos de regulação da SERCA2 possam estar atuando, entretanto, de forma independente da taxa de expressão do PLB.

Em conclusão, os dados gerados no presente trabalho indicam que as diferentes intensidades de exercício elevaram as taxas de crescimento em indivíduos de matrinxã, sendo as maiores taxas de crescimento obtidas no exercício de maior intensidade. Diferentes respostas foram encontradas em relação à MVR, sendo que o grupo EMI apresentou uma redução neste parâmetro enquanto que o grupo EI não sofreu alterações. Os resultados *in vitro* mostraram que as diferentes intensidades de exercício promoveram elevações na Fc, CBC e  $R_{TPT}$  apenas em frequências subfisiológicas, mas não acarretaram em reduções nos parâmetros analisados em relação ao grupo CT em nenhuma das frequências aplicadas. A inibição farmacológica de cada



componente indicou que as diferentes intensidades de exercício induziram modulações distintas no processo de acoplamento E-C. O grupo EMI, assim como o grupo CT, se mostrou dependente do RS durante as contrações e relaxamentos, principalmente em frequências de estimulação elevadas, enquanto que o grupo EI apresentou uma independência do RS e o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  transsarcolemal via LTCCs e NCX assumiram o papel principal durante as contrações. Os LTCCs se mostraram primordiais para a contração em todos os grupos. A interpretação dos dados pode indicar que nos grupos CT e EMI o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via NCX apresentou a função de reabastecimento do RS, enquanto que no grupo EI o NCX atuou no fornecendo  $\text{Ca}^{2+}$  durante a contração. Todos os grupos exercitados apresentaram elevações nas taxas de expressão dos LTCCs, NCX e SERCA2 mas não apresentaram alterações na expressão de PLB. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o matrinxã, ao ser submetido ao exercício natatório prolongado, apresentou modulações nos papéis relativos dos LTCCs, NCX e RS durante o acoplamento E-C ventricular. As alterações encontradas foram dependentes da intensidade exercício, uma vez que o RS se manteve importante para a ciclagem de  $\text{Ca}^{2+}$  em animais submetidos ao protocolo EMI enquanto os animais submetidos ao protocolo EI apresentaram menor dependência do RS.

## 5. CONCLUSÕES

Portanto, a partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que a submissão por 60 dias às intensidades de exercício de 5 (EL), 10 (EM), 20 (EMI) e 30  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  (EI) promoveu diferentes respostas em indivíduos de matrinxã (*Brycon amazonicus*):

- a. Todos os grupos exercitados apresentaram maiores taxas de crescimento corporal e ganho de massa em relação aos seus respectivos grupos CT e maiores taxas de crescimento acompanharam as maiores velocidades de corrente submetidas;
- b. A MVR não diferiu entre os grupos EL, EM e EI em relação aos seus respectivos grupos CT mas foi menor no grupo EMI, tais resultados indicam que, apesar das taxas de crescimento somático e ventricular terem sido equivalentes após a

- submissão à maioria dos protocolos de exercício, a intensidade de exercício pode aumentar a taxa de crescimento corporal em relação ao crescimento ventricular.
- c. Os grupos EL e EM apresentaram elevações nos valores de Fc e CBC em uma ampla faixa de freq. e nos grupos EMI e EI mostraram elevações apenas em freq. baixas;
  - d. Os grupos EL e EM apresentaram elevações nas taxas de contração  $R_{TPT}$  em uma ampla faixa de freq. e nos grupos EMI e EI mostraram elevações apenas em freq. baixas;
  - e. Os grupos EM, EMI e EI não sofreram alterações nas taxas de relaxamento ( $R_{TR50}$ ) em nenhuma das freq. suportadas. O grupo EL apresentou elevações na  $R_{TR50}$  em todas as freq. suportadas;
  - f. No grupo EL a contribuição do RS foi essencial para a geração de força em uma ampla faixa de frequências de estimulação enquanto que nos grupos EM e EMI a contribuição do RS se mostrou relevante apenas em frequências elevadas. No grupo EI a inibição funcional do RS não acarretou reduções nos valores de Fc em nenhuma das frequências analisadas, indicando que os LTCCs e o NCX assumiram o protagonismo durante a geração de força;
  - g. O grupo EL apresentou maiores taxas de expressão do NCX, menores taxas de expressão da SERCA2 e não apresentou alterações na expressão do PLB. O grupo EM apresentou maiores taxas de expressão de NCX e PLB e menores taxas de expressão da SERCA2. Tanto o grupo EMI quanto o EI apresentaram elevações nas taxas de expressão dos LTCCs, NCX e SERCA2 mas não apresentaram alterações na expressão de PLB.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho descreveu os efeitos de treinamento de exercício prolongado (60 dias) de diferentes intensidades (5, 10, 20 e 30 cm.s<sup>-1</sup>) sobre a contratilidade ventricular *in vitro* e a expressão de proteínas relacionadas com o processo de acoplamento E-C do tecido ventricular de *B. amazonicus*, uma espécie peixe muito ativa e que apresenta hábito migratório.

Todos os protocolos de exercício empregados induziram elevações nas taxas de crescimento corpóreo em relação à animais sedentários, entretanto, maiores taxas de crescimento foram presenciadas quanto maiores foram as velocidades da corrente. Tal resultado pode indicar uma relação direta entre a intensidade de exercício e a taxa de crescimento de *B. amazonicus*, corroborando os trabalhos de ARBELÁEZ-ROJAS & MORAES (2010) e FABRIZZI et. al. 2013.

A maioria das intensidades de exercício não induziu alterações na MVR, com exceção do grupo EMI onde observou-se uma redução neste parâmetro em relação ao seu respectivo grupo CT. Tais resultados indicam que diferentes intensidades de exercício pode influenciar distintamente a proporção de crescimento corporal e ventricular, podendo-se sugerir que, apesar da maior taxa de crescimento corporal, a velocidade aplicada no grupo EMI não demandou uma elevação equivalente na taxa de crescimento ventricular.

Em relação aos parâmetros de contratilidade *in vitro*, os grupos EM, EMI e EI apenas foram capazes de desempenhar contrações regulares em uma solução fisiológica com uma concentração mais elevada de Ca<sup>2+</sup> (3,0 mM) em comparação com o grupo EL (1,5 mM). Tal diferença sugere que a intensidade do treinamento de exercício pode alterar a demanda dos cardiomiócitos pelo Ca<sup>2+</sup> extracelular, fazendo com que maiores [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sejam necessários para o desempenho de contrações.

Ademais, os grupos submetidos às intensidades de exercício menores (grupos EL e EM) apresentaram incrementos mais evidentes nos valores de Fc em relação aos respectivos grupos

controle, sugerindo adequações distintas na capacidade de geração de força contrátil em função da intensidade do exercício.

É possível que as condições impostas pelos protocolos de exercício mais rigorosos (grupos EMI e EI) não tenham propiciado um incremento no desempenho contrátil em virtude da aumentada demanda contrátil e/ou de um provável déficit no suprimento de O<sub>2</sub> para a musculatura ventricular.

Os resultados indicaram que todos os grupos apresentaram modulações no papel dos componentes do acoplamento E-C. O influxo de Ca<sup>2+</sup> via NCX se mostrou importante em todos os grupos exercitados enquanto que o papel relativo do RS variou consideravelmente entre os grupos.

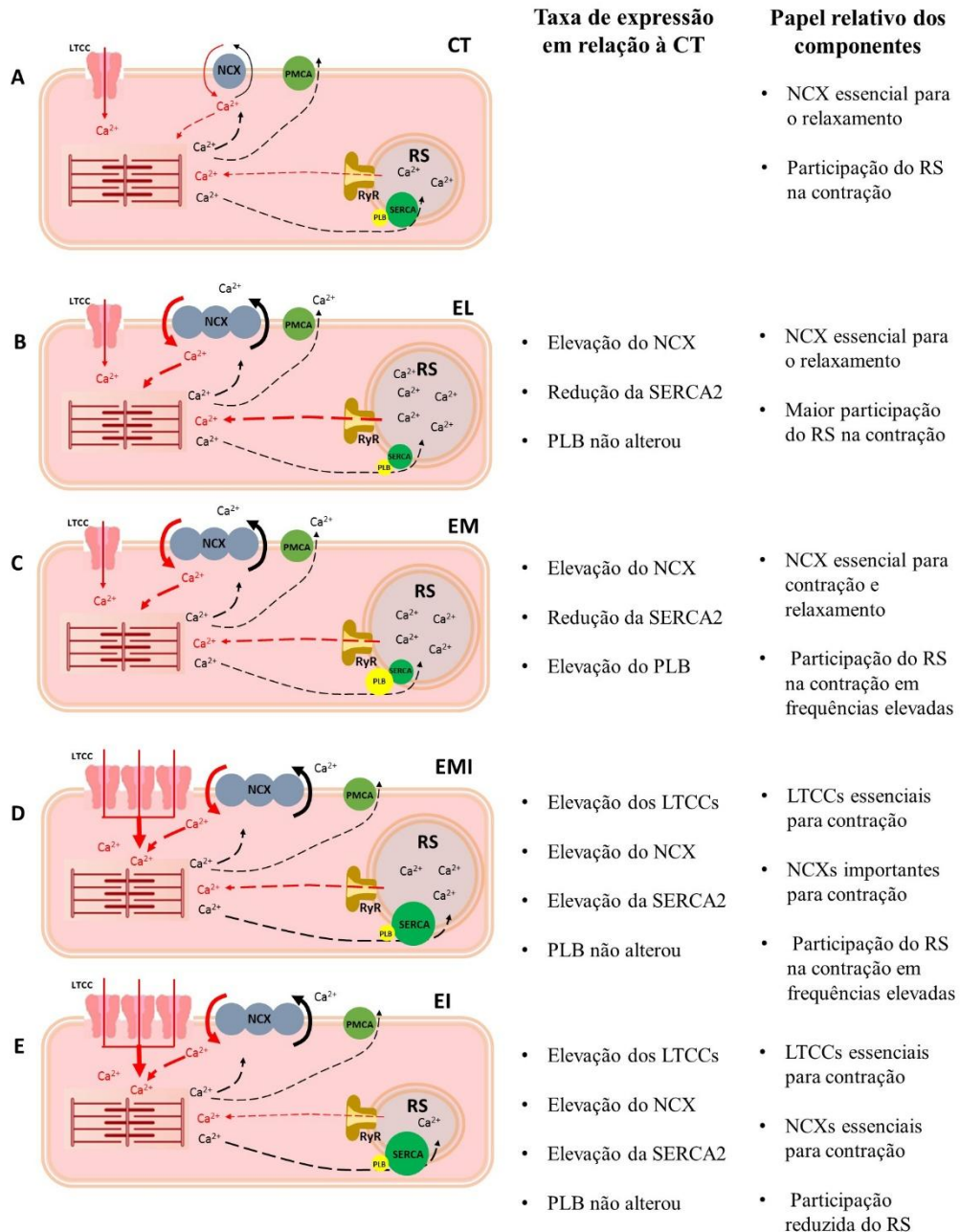
No grupo EL a contribuição do RS foi essencial para a geração de força em uma ampla faixa de frequências de estimulação (0,2-1,8Hz) enquanto que nos grupos EM e EMI a contribuição do RS se mostrou relevante apenas em frequências elevadas (1,0-1,8Hz). Entretanto, no grupo EI a inibição funcional do RS não acarretou reduções nos valores de Fc em nenhuma das frequências analisadas, indicando que os LTCCs e o NCX assumiram o protagonismo durante a geração de força.

Os protocolos de exercício desencadearam diferentes taxas de expressão dos componentes do acoplamento E-C, como mostra a Figura 27. O grupo EL apresentou maiores taxas de expressão do NCX, menores taxas de expressão da SERCA2 e não sofreu alterações na expressão do PLB. O grupo EM apresentou maiores taxas de expressão de NCX e PLB e menores taxas de expressão da SERCA2. Tanto o grupo EMI quanto o EI apresentaram elevações nas taxas de expressão dos LTCCs, NCX e SERCA2 mas não apresentaram alterações na expressão de PLB.

O presente trabalho mostrou que o matrinxã apresenta maiores taxas de crescimento quanto mantido em maiores as intensidades de exercício bem como é capaz de exibir diferentes modulações no processo de acoplamento E-C em conformidade com o grau de exercício. Tais

resultados expõe a habilidade desta espécie em adequar sua fisiologia cardíaca em resposta à condições que impõem demandas circulatórias elevadas, característica que, presumivelmente, a permite desempenhar tanto sua elevada capacidade natatória quanto os extensos períodos de nado durante migrações.

Figura 27- Representações esquemáticas do processo de acoplamento excitação-contração cardíaco de *Brycon amazonicus* nos seguintes protocolos A- Controle (CT), B- Exercício leve (EL), C- Exercício moderado (EM), D- Exercício moderadamente intenso (EMI) e E- Exercício intenso (EI) bem como o resumo dos resultados obtidos para cada grupo. As setas em vermelho indicam o movimento do íon  $Ca^{2+}$  durante a contração e as setas em preto indicam o movimento do  $Ca^{2+}$  durante o relaxamento do miócito, setas espessas indicam maior fluxo do  $Ca^{2+}$ . Brevemente, a excitação do miócito promove um influxo de  $Ca^{2+}$  via canais do tipo L (LTCC) e modo reverso do trocador  $Na^{+}/Ca^{2+}$  (NCX), o qual desencadeia a liberação de  $Ca^{2+}$ - $Ca^{2+}$  induzida pela abertura dos canais de rianodina (RyR) no retículo sarcoplasmático (RS). O  $Ca^{2+}$  é recrutado pelos miofilamentos durante a contração e, durante o relaxamento, é bombeado de volta para o RS pela  $Ca^{2+}$ -ATPase de retículo (SERCA2) ou conduzido para o meio extracelular pela ação do NCX e da bomba de  $Ca^{2+}$  da membrana plasmática (PMCA).



## 7. BIBLIOGRAFIA

- ABRAMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36–42, 2004. Disponível em: <<http://igitur-archive.library.uu.nl/med/2011-0512-200507/UUindex.html>>. Acesso em: 14 maio. 2013.
- AHO, E.; VORNANEN, M. Contractile properties of atrial and ventricular myocardium of the heart of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effects of thermal acclimation. **Journal of Experimental Biology**, v. 2677, p. 2663–2677, 1999. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/content/202/19/2663.short>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F. de; GOMES, A. R. C.; LOPES, N. P. Fish Physiology: The Physiology of Tropical Fishes. In: **The Physiology of Tropical Fishes**. [s.l: s.n.]p. 400.
- ARAÚJ-LIMA, C. A. R. M.; RUFFINO, M. L. Migratory fishes of the Brazilian Amazon. **Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**, p. 237–301, 2004.
- ARBELÁEZ-ROJAS, G. A.; INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. Atividade proteolítica e crescimento de matrinxã em natação sustentada e alimentado com dois níveis de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 11, p. 1521–1529, 2011.
- ARBELÁEZ-ROJAS, G.; MORAES, G. **Optimization of sustaining swimming speed of matrinxã *Brycon amazonicus*: performance and adaptive aspects** *Scientia Agricola*, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sa/v67n3/a01v67n3.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2013.
- BALLANTYNE, J. S.; ROBINSON, J. W. **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l: s.n.]
- BERS, D. M. Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. **Circulation research**, v. 87, p. 275–281, 2000.
- BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198–205, 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/415198a>>.
- BERS, D. M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annual review of physiology**, v. 70, p. 23–49, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17988210>>. Acesso em: 28 jan. 2013.
- BIRKEDAL, R.; SHIELS, H. A. High  $[Na^+]_i$  in cardiomyocytes from rainbow trout. **American Journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, p. R861–R866, 2007.
- BONAZZOLA, P.; EGIDO, P.; MARENGO, F. D. Lithium and KB-R7943 effects on mechanics and energetics of rat heart muscle. n. 1122, p. 1–11, 2002.
- BROWN, E. J.; BRUCE, M.; PETHER, S.; HERBERT, N. a. Do swimming fish always grow fast? Investigating the magnitude and physiological basis of exercise-induced growth in juvenile New Zealand yellowtail kingfish, *Seriola lalandi*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 327–336, 2011.
- BUENO-GUIMARÃES, H. M.; FERREIRA, C. M.; GARCIA, M. L. B.; SALDIVA, P. H. N. Tadpole Epithelium Test: Potential Use of Histopathologic Epithelial Changes to Evaluate Aquatic Pollution. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, n. 2, p. 0202–0209, ago. 2001. Disponível em: <<http://link.springer.de/link/service/journals/00128/bibs/1067002/10670202.htm>>. Acesso em: 12 jun. 2013.
- BUSHNELL, P. G.; JONES, D. R. Cardiovascular and respiratory physiology of tuna:

- adaptations for support of exceptionally high metabolic rates. **Environmental Biology of Fishes**, v. 40, n. 3, p. 303–318, 1994.
- CASTRO, V.; GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S. J.; TORGERSEN, J.; KRISTENSEN, T.; CLAIREAUX, G.; FARRELL, A. P.; TAKLE, H. Cardiac molecular-acclimation mechanisms in response to swimming-induced exercise in atlantic salmon. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55056, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3555865&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 mar. 2013.
- CERRA, M. C.; IMBROGNO, S. Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. **Acta physiologica (Oxford, England)**, p. 9–25, 30 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22129433>>. Acesso em: 27 fev. 2013.
- CHEEK, T. R.; BERRIDGE, M. J.; MORETON, R. B.; STAUDERMAN, K. a; MURAWSKY, M. M.; BOOTMAN, M. D. Quantal Ca<sup>2+</sup> mobilization by ryanodine receptors is due to all-or-none release from functionally discrete intracellular stores. **The Biochemical journal**, v. 301 (Pt 3), p. 879–883, 1994.
- CLARK, R. J.; RODNICK, K. J. Morphometric and biochemical characteristics of ventricular hypertrophy in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal of experimental biology**, v. 201, n. Pt 10, p. 1541–1552, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9556537>>.
- COSTA, M. .; OLLE, C. .; KALININ, a. .; RANTIN, F. . Role of the sarcoplasmic reticulum in calcium dynamics of the ventricular myocardium of *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi) at different temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 29, n. 2, p. 81–89, fev. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306456503000962>>. Acesso em: 18 fev. 2013.
- COSTA, M. J.; OLLE, C. D.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Influence of temperature on calcium sensitivity in the ventricular myocardium of the South American lungfish: Effects of extracellular calcium and adrenaline. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, n. 4, p. 259–266, 2005.
- DAVIES, L. A.; SC, B.; GIBSON, C. N.; BOYETT, M. R.; PH, D.; HOPKINS, P. M.; HARRISON, S. M. Myofilament Ca sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in rat ventricular myocytes. **Anesthesiology**, v. 93, n. 4, p. 1034–1044, 2000.
- DAVISON, W. The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 117, n. 1, p. 67–75, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300962996002848>>. Acesso em: 23 maio. 2013.
- DAVISON, W.; GOLDSPINK, G. the Effect of Training on the Swimming Muscles of the Goldfish (*Carassius auratus*). **J. exp. Biol**, v. 74, p. 115–122, 1978.
- DINDIA, L. A.; ALDERMAN, S. L.; GILLIS, T. E. Novel insights into cardiac remodelling revealed by proteomic analysis of the trout heart during exercise training. **Journal of Proteomics**, v. 161, p. 38–46, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.023>>.
- DOS SANTOS FILHO, L. C.; BATISTA, V. da S. Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (Characidae) na Amazônia Central. **Zoologia**, v. 26, n. 2, p. 195–203, 2009.
- EISNER, D.; BODE, E.; VENETUCCI, L.; TRAFFORD, A. Calcium flux balance in the heart. **Journal of molecular and cellular cardiology**, 5 dez. 2012. Disponível em:



<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220128>>. Acesso em: 26 fev. 2013.

EKSTRÖM, A.; AXELSSON, M.; GRÄNS, A.; BRIJS, J.; SANDBLOM, E. Influence of the coronary circulation on thermal tolerance and cardiac performance during warming in rainbow trout. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 4, p. R549–R558, 2017. Disponível em: <<http://ajpregu.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpregu.00536.2016>>.

FABRIZZI, F.; MORAES, G.; HACKBARTH, A.; DE ALMEIDA, L. C.; ARBELÁEZ-ROJAS, G.; NUNES, C. D. S. Intermittent sustained swimming in “matrinxã” *Brycon amazonicus* (Bryconidae: Bryconinae): Hematological and metabolic responses. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 425–432, 2013.

FARRELL, A.; JOHANSEN, J.; STEFFENSEN, J.; MOYES, C.; WEST, T.; SUAREZ, R. Effects of exercise training and coronary ablation on swimming performance, heart size and cardiac enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. **Can J Zool**, v. 68, p. 1174–1179, 1990.

FARRELL, A. P. Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: Insights into cardiovascular design limitations in fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 797–810, 2002.

FARRELL, A. P. Design and physiology of the heart | Physiology of Cardiac Pumping. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l: s.n.]2p. 1030–1037.

FARRELL, A. P. Design and physiology of the heart | The Coronary Circulation. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l: s.n.]2p. 1077–1084.

FARRELL, A. P.; HAMMONS, A. M.; GRAHAM, M. S.; TIBBITS, G. F. Cardiac growth in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 66, n. 11, p. 2368–2373, 1988. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/z88-351>>.

FARRELL, A. P.; JOHANSEN, J. A.; SUAREZ, R. K. Effects of exercise-training on cardiac performance and muscle enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 9, n. 4, p. 303–312, 1991.

FARRELL, A. P.; PIEPERHOFF, S. DESIGN AND PHYSIOLOGY OF THE HEART | Cardiac Anatomy in Fishes. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 998–1005.

FARRELL, A. P.; THORARENSEN, H.; AXELSSON, M.; CROCKER, C. E.; GAMPERL, A. K.; CECH, J. J. Gut blood flow in fish during exercise and severe hypercapnia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 128, n. 3, p. 549–561, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643300003354>>.

FARRELL, a P.; GAMPERL, a K.; BIRTWELL, I. K. Prolonged swimming, recovery and repeat swimming performance of mature sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* exposed to moderate hypoxia and pentachlorophenol. **The Journal of experimental biology**, v. 201, n. Pt 14, p. 2183–2193, 1998.

FERREIRA, M. S.; ARIDE, P. H. R.; SILVA, M. de N. P. da; VAL, A. L. Efeito da quantidade de proteína na dieta e treinamento físico sobre parâmetros fisiológicos e zootécnicos de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Günther 1869). **Acta Amazonica**, v. 43, n. 4, p. 439–446, 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0044-59672013000400005&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672013000400005&lang=pt)>.

- FERREIRA, M. S.; OLIVEIRA, A. M. De; VAL, A. L. Velocidade crítica de natação (Ucrit) de matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exposição à hipoxia. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 4, p. 699–704, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0044-59672010000400009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672010000400009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>.
- FRASCÁ-SCORVO, C. M. D.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B. COMPORTAMENTO ALIMENTAR DO MATRINXÃ (*Brycon cephalus*) NO PERÍODO DE TEMPERATURAS MAIS BAIXAS. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 1–5, 2001.
- GALLAUGHER, P. E.; THORARENSEN, H.; KIESSLING, A.; FARRELL, a P. Effects of high intensity exercise training on cardiovascular function, oxygen uptake, internal oxygen transport and osmotic balance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during critical speed swimming. **The Journal of experimental biology**, v. 204, n. Pt 16, p. 2861–2872, 2001.
- GALLI, G. L. J.; LIPNICK, M. S.; SHIELS, H. a; BLOCK, B. a. Temperature effects on Ca<sup>2+</sup> cycling in scombrid cardiomyocytes: a phylogenetic comparison. **The Journal of experimental biology**, v. 214, p. 1068–1076, 2011.
- GALLI, G. L. J.; TAYLOR, E. W.; SHIELS, H. a. Calcium flux in turtle ventricular myocytes. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 291, n. 6, p. R1781-9, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887918>>. Acesso em: 17 abr. 2013.
- GAMPERL, a K.; FARRELL, a P. Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. **The Journal of experimental biology**, v. 207, n. Pt 15, p. 2539–50, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15201287>>. Acesso em: 13 mar. 2013.
- GENGE, C.; HOVE-MADSEN, L.; TIBBITS, G. F. Functional and Structural Differences in Atria Versus Ventricles in Teleost Hearts. In: **New Advances and Contributions to Fish Biology**. [s.l: s.n.]p. 221–245.
- GENSAC, E.; MARTINEZ, J. M.; VANTREPOTTE, V.; ANTHONY, E. J. Seasonal and inter-annual dynamics of suspended sediment at the mouth of the Amazon river: The role of continental and oceanic forcing, and implications for coastal geomorphology and mud bank formation. **Continental Shelf Research**, v. 118, p. 49–62, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.csr.2016.02.009>>.
- GESSER, H. Cardiac force-interval relationship , adrenaline and sarcoplasmic reticulum in rainbow trout. p. 278–285, 1996.
- GILLIS, T. E.; TIBBITS, G. F. Beating the cold: the functional evolution of troponin C in teleost fish. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 132, n. 4, p. 763–72, ago. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095861>>.
- GRIMES, A. C.; KIRBY, M. L. The outflow tract of the heart in fishes: Anatomy, genes and evolution. **Journal of Fish Biology**, v. 74, n. 5, p. 983–1036, 2009.
- HACKBARTH, A.; MORAES, G. Biochemical responses of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) after sustained swimming. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 11, p. 1070–1078, ago. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2109.2006.01530.x>>. Acesso em: 30 abr. 2013.
- HAGHIGHI, K.; KOLOKATHIS, F.; PATER, L.; LYNCH, R. A.; ASAH, M.; GRAMOLINI, A. O.; FAN, G. C.; TSIAPRAS, D.; HAHN, H. S.; ADAMOPOULOS, S.; LIGGETT, S. B.;

- DORN, G. W.; MACLENNAN, D. H.; KREMASTINOS, D. T.; KRANIAS, E. G. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 6, p. 869–876, 2003.
- HANLEY, P. J.; TER KEURS, H. E. D. J.; CANNELL, M. B. Excitation-contraction coupling in the heart and the negative inotropic action of volatile anesthetics. **Anesthesiology**, v. 101, n. 4, p. 999–1014, out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15448535>>.
- HOVE-MADSEN, L.; LLACH, A.; TIBBITS, G. F.; TORT, L. Triggering of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release and contraction by reverse mode Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in trout atrial myocytes. **American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 284, n. 5, p. R1330-9, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531782>>.
- HOVE-MADSEN, L.; LLACH, A.; TORT, L.; QUAN, L. T. Quantification of Ca<sup>2+</sup> uptake in the sarcoplasmic reticulum of trout ventricular myocytes. **American Physiological Society**, n. 23, p. 2070–2080, 1998.
- HOVE-MADSEN, L.; TORT, L. Characterization of the relationship between Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange rate and cytosolic calcium in trout cardiac myocytes. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 441, p. 701–708, 2001.
- HUANG, J.; HOVE-MADSEN, L.; TIBBITS, G. F. SR Ca<sup>2+</sup> refilling upon depletion and SR Ca<sup>2+</sup> uptake rates during development in rabbit ventricular myocytes. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 293, p. 1906–1915, 2007.
- ICARDO, J. M.; COLVEE, E. The Atrioventricular Region of the Teleost Heart. A Distinct Heart Segment. **Anatomical Record**, v. 294, n. 2, p. 236–242, 2011.
- IMBERT-AUVRAY, N.; MERCIER, C.; HUET, V.; BOIS, P. Sarcoplasmic reticulum: a key factor in cardiac contractility of sea bass *Dicentrarchus labrax* and common sole *Solea solea* during thermal acclimations. **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 183, n. 4, p. 477–89, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263664>>. Acesso em: 25 nov. 2013.
- JANVIER, N. C.; BOYETT, M. R. The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. 1996.
- JENSEN, Bjarke et al. Evolution of the Sinus Venosus from Fish to Human. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 14–28, 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2308-3425/1/1/14/>>
- JOBLING, M.; BAARDVIK, B. M.; CHRISTIANSEN, J. S.; JORGENSEN, E. H. The effect of prolonged exercise training on growth performance and production parameters in fish. **Aquaculture International**, v. 1, p. 95–111, 1993.
- KADAMBI, V. J.; PONNIAH, S.; HARRER, J. M.; HOIT, B. D.; DORN, G. W.; WALSH, R. A.; KRANIAS, E. G. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 2, p. 533–539, 1996.
- KEEN, J. E.; FARRELL, A. P.; TIBBITS, G. F.; BRILL, R. W. Cardiac Physiology in Tunas .2. Effect of Ryanodine, Calcium, and Adrenaline on Force Frequency Relationships in Atrial Strips from Skipjack Tuna, *Katsuwonus-Pelamis*. **Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie**, v. 70, p. 1211–1217, 1992.
- KIEFFER, J. D. Perspective - Exercise in fish: 50+ years and going strong. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 156, n. 2, p.

163–168, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.02.009>>.

KRANIAS, E. G.; HAJJAR, R. J. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. **Circulation Research**, v. 110, n. 12, p. 1646–1660, 2012.

LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M.; MORRISSETTE, J. M.; BLANK, J. M.; BLOCK, B. A. Temperature dependence of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2) in the ventricles of tuna and mackerel. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 2, p. R398–R404, 2004. Disponível em: <<http://ajpregu.physiology.org/ajpregu/286/2/R398.full.pdf>>.

LANNER, J. T.; GEORGIU, D. K.; JOSHI, A. D.; HAMILTON, S. L. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 11, p. a003996, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2964179&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28 jan. 2013.

LARBIG, R.; TORRES, N.; BRIDGE, J. H. B.; GOLDHABER, J. I.; PHILIPSON, K. D. Activation of reverse Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange by the Na<sup>+</sup> current augments the cardiac Ca<sup>2+</sup> transient: evidence from NCX knockout mice. **The Journal of physiology**, v. 588, n. Pt 17, p. 3267–76, 2010.

LAYLAND, J.; YOUNG, I. S.; ALTRINGHAM, J. D. The length dependence of work production in rat papillary muscles in vitro. **The Journal of experimental biology**, v. 198, p. 2491–2499, 1995.

MAGNONI, L. J.; CRESPO, D.; IBARZ, A.; BLASCO, J.; FERNÁNDEZ-BORRÀS, J.; PLANAS, J. V. Effects of sustained swimming on the red and white muscle transcriptome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a carbohydrate-rich diet. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 166, n. 3, p. 510–521, 2013.

MCKENZIE, D. J. Swimming and other activities | Energetics of Fish Swimming. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l.: s.n.]3p. 1636–1644.

MEDEIROS, A.; ROLIM, N. P. L.; OLIVEIRA, R. S. F.; ROSA, K. T.; MATTOS, K. C.; CASARINI, D. E.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M.; KRIEGER, J. E.; NEGRÃO, C. E.; BRUM, P. C. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 104, n. November 2007, p. 103–109, 2008.

MEYER, M.; BLUHM, W. F.; HE, H.; POST, S. R.; GIORDANO, F. J.; LEW, W. Y.; DILLMANN, W. H. Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 12, p. H779–H785, 1999.

MOLANO, A. S. F.; MEG, G. M. A. ARTICLE Regulation of dihydropyridine receptor levels in skeletal and cardiac muscle by exercise training. p. 364–369, 1995.

MONTEIRO, D. A.; KALININ, A. L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; VASCONCELOS, E. S.; RANTIN, F. T. Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein from *Rhinocerosphis alternatus* snake venom promotes positive inotropism and chronotropism in fish heart. **Toxicon**, v. 110, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.012>>.

MONTEIRO, D. A.; THOMAZ, J. M.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Cardiorespiratory responses to graded hypoxia in the neotropical fish matrinxã (*Brycon amazonicus*) and traíra (*Hoplias malabaricus*) after waterborne or trophic exposure to inorganic mercury. **Aquatic**

**Toxicology**, v. 140–141, p. 346–355, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.011>>.

MORÁN, M.; SABORIDO, A.; MEGÍAS, A. Ca<sup>2+</sup> regulatory systems in rat myocardium are altered by 24 weeks treadmill training. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 446, n. 2, p. 161–8, maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12739153>>. Acesso em: 6 maio. 2013.

MOUNIC-SILVA, C. E.; LEITE, R. G. Abundance of young-of-the-year migratory Characiforms in floodplain areas of the middle Solimões-Amazon River at flooding 2007/2008. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n. 1, p. 118–124, fev. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0426.2012.02047.x>>.

NAKAUTH, A. C. S. S.; VILLACORTA-CORREA, M. A.; FIGUEIREDO, M. R.; BERNARDINO, G.; FRANÇA, J. M.; NAKAETH, A. C. S. S.; VILLACORTA-CORREA, M. A.; FIGUEIREDO, M. R.; BERNARDINO, G.; FRANÇA, J. M. Embryonic and larval development of *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829). **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 109–116, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-69842016000100109&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842016000100109&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

NELSON, J. A.; GOTWALT, P. S.; REIDY, S. P.; WEBBER, D. M. Beyond Ucrit: Matching swimming performance tests to the physiological ecology of the animal, including a new fish “drag strip”. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 133, n. 2, p. 289–302, 2002.

OLSON, K. R. Circulation | Circulatory System Design: Roles and Principles. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l: s.n.]2p. 977–983.

PIEPERHOFF, S.; BENNETT, W.; FARRELL, A. P. The intercellular organization of the two muscular systems in the adult salmonid heart, the compact and the spongy myocardium. **Journal of Anatomy**, v. 215, n. 5, p. 536–547, 2009.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. [s.l: s.n.]

RISSOLI, R. Z.; VASCONCELOS, E. da S.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Effects of exercise training on excitation-contraction coupling, calcium dynamics and protein expression in the heart of the Neotropical fish *Brycon amazonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 214, n. September, p. 85–93, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643317302179>>.

RIVAROLI, L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish: *Curimbata*, *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae), and *trahira*, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae). **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 145, n. 3, p. 322–7, nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931079>>. Acesso em: 2 fev. 2013.

ROCHA, M. L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Importance of the sarcoplasmic reticulum and adrenergic stimulation on the cardiac contractility of the neotropical teleost r under different thermal conditions. **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 177, n. 7, p. 713–21, out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562053>>. Acesso em: 2 fev. 2013.

RODNICK, K. J.; PLANAS, J. V. **7 – The Stress and Stress Mitigation Effects of Exercise: Cardiovascular, Metabolic, and Skeletal Muscle Adjustments**. [s.l: s.n.]v. 35

ROLIM, N. P. L.; MEDEIROS, A.; ROSA, K. T.; MATTOS, K. C.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M.; KRIEGER, J. E.; NEGRÃO, C. E.; BRUM, P. C. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca<sup>2+</sup> handling protein expression in heart failure. **Physiological genomics**, v. 29, n. 3, p. 246–52, 11 maio 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244791>>. Acesso em: 5 mar. 2013.

SANGER, A. M. Effects of Training on Axial Muscle of 2 Cyprinid Species - *Chondrostoma-Nasus* (L) and *Leuciscus-Cephalus* (L). **Journal of Fish Biology**, v. 40, n. 4, p. 637–646, 1992.

SANGER, A. M.; POTSCHER, U. Endurance Exercise Training Affects Fast White Axial Muscle in the Cyprinid Species *Chalcalburnus Chalcoides Mento* (Agassiz, 1832), Cyprinidae, Teleostei. **Basic Applied Myology**, v. 10, n. 6, p. 297–300, 2000.

SAVIO-GALIMBERTI, E.; PONCE-HORNOS, J. E. Effects of caffeine, verapamil, lithium, and KB-R7943 on mechanics and energetics of rat myocardial bigeminies. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 2, p. H613-23, 2006. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16055510](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16055510)>.

SCRIVEN, D. R. L.; MOORE, E. D. W. Ca<sup>(2+)</sup> channel and Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchange localization in cardiac myocytes. **Journal of molecular and cellular cardiology**, 7 dez. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220152>>. Acesso em: 6 fev. 2013.

SEDMERA, D.; WANG, T. Ontogeny and phylogeny of the vertebrate heart. **Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart**, p. 1–231, 2012.

SHIELS, H. A. Design and physiology of the heart | Cardiac Cellular Length-Tension Relationship. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l: s.n.]2p. 1060–1066.

SHIELS, H. A.; FREUND, E. V.; FARRELL, A. P.; BLOCK, B. A. The sarcoplasmic reticulum plays a major role in isometric contraction in atrial muscle of yellowfin tuna. v. 890, p. 881–890, 1999.

SHIELS, H. A.; GALLI, G. L. The sarcoplasmic reticulum and the evolution of the vertebrate heart. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, n. 6, p. 456–469, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25362639>>.

SHIELS, H. A.; PAAJANEN, V.; VORNANEN, M. Sarcolemmal ion currents and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in ventricular myocytes from the cold stenothermic fish, the burbot (*Lota lota*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. Pt 16, p. 3091–100, 2006.

SHIELS, H. a.; SITSAPESAN, R. Is there something fishy about the regulation of the ryanodine receptor in the fish heart? **Experimental Physiology**, v. 0, p. n/a-n/a, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/EP085136>>.

SHIELS, H. a; DI MAIO, a; THOMPSON, S.; BLOCK, B. a. Warm fish with cold hearts: thermal plasticity of excitation-contraction coupling in bluefin tuna. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 278, n. 1702, p. 18–27, 7 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2992732&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 mar. 2013.

SHIELS, H. a; FARRELL, a P. The effect of ryanodine on isometric tension development in isolated ventricular trabeculae from Pacific mackerel (*Scomber japonicus*). **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 125, n. 3, p. 331–41, mar. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794962>>.

SIMÕES, K.; VICENTINI, C. A.; ORSI, A. M.; CRUZ, C. Myoarchitecture and vasculature of

- the heart ventricle in some freshwater teleosts. **Journal of Anatomy**, v. 200, n. 5, p. 467–475, 2002.
- SMITH, G. L.; ALLEN, D. G. Effects of Metabolic Blockade on Intracellular Calcium Concentration in Isolated Ferret Ventricular Muscle. p. 1223–1237, [s.d.]
- STEFFENSEN, J. F.; FARRELL, A. P.; FARRELL, T. Swimming performance, venous oxygen tension and cardiac performance of coronary-ligated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to progressive hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 119, n. 2, p. 585–592, 1998.
- STEPHENSON, A.; ADAMS, J. W.; VACCAREZZA, M. The vertebrate heart: an evolutionary perspective. **Journal of Anatomy**, v. 231, n. 6, p. 787–797, 2017.
- THOMAZ, J. M. **Habitat, hábito e morfologia cardíaca: Influência destes fatores sobre as respostas cardiorespiratórias à hipóxia e alterações térmicas em espécies de peixe ecologicamente distintas**. 2011. Universidade Federal de São Carlos, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/1231/4026.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.
- THORARENSEN, H. Ventilation and animal respiration | The Effect of Exercise on Respiration. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l: s.n.]p. 812–819.
- TITTU, V.; VORNANEN, M. Cold adaptation suppresses the contractility of both atrial and ventricular muscle of the crucian carp heart. **Journal of Fish Biology**, v. 59, n. 1, p. 141–156, jul. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8649.2001.tb02344.x>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
- VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Fishes of the Amazon and Their Environment**. [s.l: s.n.]v. 32
- VASSALLE, M.; VASSALLE, M.; LIN, C. Calcium Overload and Cardiac Function. **Journal of biomedical science**, v. 16, n. July 2004, 2004.
- VORNANEN, M. Sarcolemmal Ca influx through L-type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 272, n. 5 41-5, p. R1432–R1440, 1997.
- VORNANEN, M. L-type Ca<sup>2+</sup> current in fish cardiac myocytes: effects of thermal acclimation and beta-adrenergic stimulation. **The Journal of experimental biology**, v. 201, n. Pt 4, p. 533–47, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9438829>>.
- VORNANEN, M. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange current in ventricular myocytes of fish heart: Contribution to sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> influx. **Journal of Experimental Biology**, v. 202, n. 13, p. 1763–1775, 1999a.
- VORNANEN, M. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange current in ventricular myocytes of fish heart: contribution to sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> influx. **The Journal of experimental biology**, v. 202 (Pt 13, p. 1763–75, jul. 1999b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359679>>.
- VORNANEN, M. Temperature and Ca<sup>2+</sup> dependence of [3H]ryanodine binding in the burbot (*Lota lota* L.) heart. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 290, n. 2, p. R345–R351, 2006.
- VORNANEN, M. Design and physiology of the heart | Action Potential of the Fish Heart. In: **Encyclopedia of Fish Physiology**. [s.l: s.n.]2p. 1038–1044.
- VORNANEN, M. Electrical Excitability of the Fish Heart and Its Autonomic Regulation. **Fish Physiology**, 2017.

VORNANEN, M.; HAVERINEN, J. A significant role of sarcoplasmic reticulum in cardiac contraction of a basal vertebrate, the river lamprey (*Lampetra fluviatilis*). **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 207, n. 2, p. 269–79, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22943571>>. Acesso em: 5 fev. 2013.

VORNANEN, M.; SHIELS, H. A.; FARRELL, A. P. Plasticity of excitation – contraction coupling in fish cardiac. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 132, p. 827–846, 2002a.

VORNANEN, M.; SHIELS, H. a; FARRELL, A. P. Plasticity of excitation-contraction coupling in fish cardiac myocytes. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 132, n. 4, p. 827–46, ago. 2002b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095866>>.

WALKER, M. G.; EMERSON, L. Sustained swimming speeds and myotomal muscle function in the trout, *Salmo gairdneri*. **Journal of Fish Biology**, v. 13, n. 4, p. 475–481, 1978.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 367–373, 2007.

ZANIBONI-FILHO, E. 1985. **Biologia da reprodução do matrinxã, *Brycon cephalus*** (Gunther, 1869) (Teleostei, Characidae). Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, 134p

## 8. APÊNDICE





# Effects of exercise training on excitation-contraction coupling, calcium dynamics and protein expression in the heart of the Neotropical fish *Brycon amazonicus*



Rafael Zanelli Rissoli, Eliton da Silva Vasconcelos, Francisco Tadeu Rantin, Ana Lúcia Kalinin\*

Department of Physiological Sciences, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

### Keywords:

*Brycon amazonicus*  
Fish  
Swimming exercise  
NCX  
SERCA  
Phospholamban

## ABSTRACT

Matrinxã (*Brycon amazonicus*) is a great swimming performance teleost fish from the Amazon basin. However, the possible cardiac adaptations of this ability are still unknown. Therefore, the aim of the present work was to investigate the effects of prolonged exercise (EX group - 60 days under  $0.4 \text{ BL}\cdot\text{s}^{-1}$ ) on ventricular contractility by (i) *in-vitro* analysis of contractility comparing the relative roles of sodium/calcium exchanger (NCX) and sarcoplasmic reticulum (SR) in the excitation-contraction (E-C) coupling and (ii) molecular analysis of NCX, sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA2) and phospholamban (PLB) expression and quantification. The exercise training significantly improved twitch tension, cardiac pumping capacity and the contraction rate when compared to controls (CT). Inhibition of the NCX function, replacing  $\text{Na}^{+}$  by  $\text{Li}^{+}$  in the physiological solutions, diminished cardiac contractility in the EX group, reduced all analyzed parameters under both high and low stimulation frequencies. The SR blockage, using  $10 \mu\text{M}$  ryanodine, caused  $\sim 50\%$  tension reduction in CT at most analyzed frequencies while in EX, reductions (34–54%) were only found at higher frequencies. SR inhibition also decreased contraction and relaxation rates in both groups. Additionally, higher post-rest contraction values were recorded for EX, indicating an increase in SR  $\text{Ca}^{2+}$  loading. Higher NCX and PLB expression rates and lower SERCA2 rates were found in EX. Our data indicate that matrinxã presents a modulation in E-C coupling after exercise-training, enhancing the SR function under higher frequencies. This was the first study to functionally analyze the effects of swimming-induced exercise on fish cardiac E-C coupling.

## 1. Introduction

Some fishes are usually described as “active” due to their remarkable swimming capacity to overcome high stream speeds and/or maintain sustained swimming for extended periods (Bushnell and Jones, 1994; Ballantyne and Robinson, 2011). In laboratory conditions, the approach to expose fish to different levels and periods of swimming activity is defined as exercise-training and consists of submitting fish to a controlled water flow (see Kieffer, 2010).

Several cardiovascular adjustments in fishes induced to extended exercise-training include increases in stroke volume (Farrell et al., 1991), hematocrit (Gallaugh et al., 2001), tissue perfusion (Sanger and Potscher, 2000) and relative ventricular size (Davison, 1997). Additionally, Castro et al. (2013), studied Atlantic salmon (*Salmo salar*) after 70 days under  $1.31 \text{ body lengths}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $\text{BL}\cdot\text{s}^{-1}$ ) swimming exercise and found increases in cardiac gene expression rates of  $\text{Ca}^{2+}$  handling proteins. However, no functional data on the exercise-induced effects in fish cardiac contractility is currently available.

Cardiac excitation–contraction coupling (E-C) is the process from electrical excitation of the myocyte to the contraction of the heart, and depends on a dynamic  $\text{Ca}^{2+}$  influx ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) and efflux through cardiomyocytes (Bers, 2002). This process initiates with the activation of the sarcolemmal voltage-gated slow  $\text{Ca}^{2+}$  channels or L-type channels (LTCCs) and consequent  $\text{Ca}^{2+}$  influx (Bers, 2008). In adult mammals, a large fraction of  $\text{Ca}^{2+}$  is stored inside the sarcoplasmic reticulum (SR), which is released to the cytoplasm via  $\text{Ca}^{2+}$  activation of the SR ryanodine receptors (RyR), a process known as  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR) (Lanner et al., 2010; Eisner et al., 2012). During relaxation, the  $\text{Ca}^{2+}$  fraction released from SR is transported back by the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2), which is regulated by phospholamban (PLN) and the small amount of remaining  $\text{Ca}^{2+}$  is extruded to the extracellular medium by the  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) and sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Bers, 2000).

In some fish species, the longer and thinner cardiomyocyte architecture reduces the diffusional distance to the extracellular medium, making the sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  influx via LTCCs and/or reverse mode

\* Corresponding author at: Federal University of São Carlos, UFSCar, Via Washington Luis Km 235, 13566 – 905, São Carlos, SP, Brazil.  
E-mail address: [akalinin@ufscar.br](mailto:akalinin@ufscar.br) (A.L. Kalinin).

NCX sufficient to promote the contraction without significant participation of SR (Gillis and Tibbitts, 2002; Vornanen, 1997, 1999). Nevertheless, a great diversity in this process can be found among fish species (Vornanen et al., 2002; Shiels and Sitsapesan, 2015) and essential SR contributions for  $\text{Ca}^{2+}$  cycling were described during atrial and ventricular contractions in tunas (Keen et al., 1992; Shiels et al., 1999; Shiels and Farrell, 2000; Galli et al., 2011) and for atrial contraction in salmonids (Gesser, 1996; Hove-Madsen et al., 1998).

According to Shiels and Galli (2014), a greater SR participation in the cardiac E-C coupling of highly active species appears to be a general principle that can be applied not only to fish, but also to all vertebrates (Shiels and Galli, 2014). However, sedentary fish species as the Neotropical trahira, *Hoplias malabaricus* (Rivaroli et al., 2006) and marble swamp eel, *Synbranchus marmoratus* (Rocha et al., 2007) also depend on SR  $\text{Ca}^{2+}$  stores for cardiac contraction, suggesting a relationship between the phylogeny of these species and the SR functionality. Additionally, only one study has analyzed the ventricular E-C coupling of a very active Neotropical fish (*Prochilodus lineatus*), showing evidence that the SR is important for tension development (Rivaroli et al., 2006).

Thus, in their natural environments, tropical fish are frequently exposed to the stream flow, swimming upstream or maintaining their position against the current. This imposition demands constant effort, possibly triggering modulations on cardiac E-C coupling that may not be found in sedentary species. Additionally, most studies on exercise physiology in fish have been conducted on salmonids while tropical fishes have largely been ignored (Kieffer, 2010).

Matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829), is a Neotropical teleost fish native of lotic (mean water speed 1–2  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and warm (ranging between 24 and 32 °C) rivers in the Amazon basin (Almeida-Val et al., 2005; Gensac et al., 2016). This species presents rheophilic habits, performs seasonal upstream migrations (Nakauth et al., 2016) and is able to achieve high swimming speeds (~6  $\text{BL}\cdot\text{s}^{-1}$ ) even under hypoxic conditions (Ferreira et al., 2010, 2013). Indeed, prolonged exercise-training regimes (2–3  $\text{BL}\cdot\text{s}^{-1}$  for 30–72 days) were able to improve the body growth rate and mass gain of juvenile matrinxãs (Hackbarth and Moraes, 2006; Ferreira et al., 2013).

The present study characterizes for the first time the ventricular tension generation and contractile dynamics in exercised fish. We performed (i) *in-vitro* analysis of contractility, accessing the roles of NCX and SR, and (ii) protein expression analysis of NCX, SERCA2 and PLB in matrinxã under sedentary conditions and after continuous exercise-training.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Specimens of *B. amazonicus* ( $n = 32$ ) were obtained from the Santa Candida Fish Farm (Santa Cruz da Conceição SP, Brazil) and were kept in 500 L holding tanks supplied with a circulation of dechlorinated and continuously aerated water ( $\text{Pw O}_2 > 120$  mmHg) for at least 60 days of stabilization before submission to the different protocols. During this period, fish were fed *ad libitum* with commercial fish pelleted feed (30% protein).

### 2.2. Swimming-induced exercise

After acclimation to laboratory conditions, animals were anesthetized by immersion in 0.1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  benzocaine solution and were then weighed and measured. Fish were randomly divided into two experimental groups ( $n = 16$  each) and placed in two round 100 L experimental tanks. The central portion of each tank was blocked with a plastic cylinder (25 cm diameter and 80 cm height) and the upper part of it was fixed to an end of a horizontal water pipe, also connected to a water pump (BCR-2010, 1cv, Schneider). The medial portion of the horizontal pipe was coupled to two other diagonally drilled pipes,

disposed vertically, 15 cm distant from each other. The water pump was able to aspirate water from the lower portion of the tank and eject it into this pipe system, generating a circular water flow. The water speed was adjusted by limiting the pump output flow. Tanks were maintained with a continuous renewal of water, constant aeration ( $\text{Pw O}_2 > 120$  mmHg) and controlled temperature ( $25.5 \pm 0.15$  °C). The water temperature was chosen as it was considered adequate for matrinxã farming (Frasca-Scorvo et al., 2001; Guimarães and Storti-Filho, 2003). The number of animals per tank was selected based on the fact that this species presents better feeding behavior when in groups of 15 animals or higher (authors observation). The exercised group (EX,  $\text{Wb} = 266 \pm 13$  g;  $\text{Lb} = 25.5 \pm 0.4$  cm) was maintained in a circular water flow of  $10.25 \pm 0.15$   $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  speed, ~0.4 body length per second ( $\text{BL}\cdot\text{s}^{-1}$ ). The mean water speed inside the tank was kept around  $10.3 \pm 0.5$   $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  closer to the center,  $10.5 \pm 0.2$   $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  in the medial portion and  $9.93 \pm 0.6$   $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  in the edge of the tank. The control group (CT,  $\text{Wb} = 260 \pm 16$  g;  $\text{Lb} = 25.1 \pm 0.4$  cm) was maintained in a free swimming condition under static water. Throughout the protocols, both groups were fed *ad libitum* once a day with commercial pelleted feed for fish (30% protein) until 24 h before euthanasia. In both tanks (CT and EX), algae and excrement were removed with siphon (3 times a week during ~20 min) when the water flow was interrupted in the EX tank. The water flow was also interrupted in EX during the daily feeding period (~10 min) and then restarted. Both groups were kept under these conditions for 60 days.

### 2.3. Euthanasia and Relative Ventricular Mass (RVM)

After completing the experimental period, fish from both groups were euthanized by cervical fracture and spinal cut and then weighed and measured. The ventricles were carefully removed and weighed ( $\text{Wv}$  - g) to obtain the ventricular mass (mean  $\pm$  SEM) which was expressed as a percentage of body mass (relative ventricular mass, RVM - % of  $\text{Wb}$ ) and immediately transferred to an ice-cold physiological solution. Subsequently, ventricles were divided into the two experimental approaches: *in vitro* measurements of tension contraction and protein expression (immediately frozen at  $-80$  °C).

### 2.4. In vitro experiments

Ten animals from each experimental protocol ( $n = 10$ ) were randomly designated for the *in vitro* analysis. Four 1 mm thickness strips (mean length  $2.5 \pm 0.2$  mm and mass  $3.0 \pm 0.2$  mg) were excised from each ventricle and transferred to an oxygenated bathing medium containing (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 0.94  $\text{MgCl}_2$ , 1.0  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 30  $\text{NaHCO}_3$ , 3.0  $\text{CaCl}_2$ , 10 glucose and pH adjusted to 7.4 with  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . The saline was continuously bubbled with a gas mixture of 2%  $\text{CO}_2$  and 98%  $\text{O}_2$  and the temperature was kept at 25 °C by a temperature-controlled water bath.

The ends of the strips were attached to two metal split rings: one free and another coupled to a 10 cm metal thread. The ends of the metal threads were attached to isometric force transducers (Grass FT.03 Transducer, Grass Technologies, West Warwick, RI, USA) and the rings, at the other end, were attached to platinum electrodes connected to a Grass S88 stimulator which delivered electrical square pulses. The stimulation was standardized at 8 ms and 90 V.

Preparations were stretched to obtain the maximum induced tension and stimulated at 0.2 Hz (12 bpm) for 40 min to stabilization before tension recordings. The stimulation was increased until the frequency of at least 80% of the strips was still able to contract regularly. Data were recorded and analyzed using AcqKnowledge MP150 (Biopac Systems Inc., USA). The length and wet mass of each strip were measured and the isometric twitch tension ( $\text{Tt}$ ) relative to the cross-sectional area ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) was calculated assuming a muscle density of  $1.06$   $\text{mg}\cdot\text{mm}^{-3}$  (Layland et al., 1995). The  $\text{Tt}$  values of each contraction were divided by their respective values of time-to-peak tension (TPT-

seg) and the time to 50% relaxation ( $TR_{50-seg}$ ) resulting in rates of peak tension ( $R_{TPT}$ -  $mN\cdot mm^{-2}\cdot s^{-1}$ ) and rates of 50% relaxation ( $R_{TR_{50}}$ -  $mN\cdot mm^{-2}\cdot s^{-1}$ ). The cardiac-pumping-capacity (CPC) was calculated as a product of Tt values and the correspondent stimulation frequency in bpm.

The effect of increments on stimulation frequency on the contractility of ventricular strips was analyzed by an increasing pacing rate from 0.2 Hz until a frequency in which at least 80% of the strips were still able to contract regularly. The effect of a diastolic pause on Tt was measured by interrupting the normal pacing at 0.2 Hz for 30 s. The first contraction after the pause was compared to the last contraction in a steady-state train.

In order to evaluate the contribution of SR on the cardiac contractility, the protocols were also performed in the presence of 10  $\mu M$  of ryanodine. This drug binds to RyRs and locks them into an open state, avoiding the SR  $Ca^{2+}$  store, causing a functional blockage of SR as  $Ca^{2+}$  donator (Cheek et al., 1994). To assess the importance of NCX,  $Li^+$  (125 mM) replaced  $Na^+$  in the physiological solution (Smith and Allen, 1988; Savio-Galimberti and Ponce-Hornos, 2006; Monteiro et al., 2016). Although it is not the most appropriate method to study NCX, using lithium provides an indication of its functionality, to be corroborated by protein expression. According to Bonazzola et al. (2002), this ion inhibits  $Ca^{2+}$  entry via NCX giving support to the participation of this exchanger to  $Ca^{2+}$  influx from the extracellular space in the cardiac muscle.

## 2.5. Protein expression of NCX, SERCA2, and PLB

Six animals from each experimental protocol ( $n = 6$ ) were randomly chosen to analyze the protein expression. Western blotting was performed as described by Monteiro et al. (2016). Frozen ventricles were homogenized in an ice-cold extraction buffer (50 mM Tris pH 7.4, 250 mM Sucrose, and 1 mM EDTA) and centrifuged at 10,000 G for 40 min at 4 °C. To obtain the microsomal fractions of proteins, the supernatants were centrifuged at 100,000 G for 60 min at 4 °C and the pellets were resuspended in 150  $\mu L$  of a Tris-EDTA buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4). Proteins were quantified using a Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad, CA, USA).

Samples of 100  $\mu g$  of protein were subjected to SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel for NCX, SERCA2, and PLB) and transferred onto PVDF membranes in a mini trans-blot transfer cell (Bio-RadLtd) filled with transfer buffer (25 mM Tris, 190 mM glycine, 0.05% SDS and 20% methanol). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline plus 0.1% Tween-20 for 90 min at room temperature and then incubated overnight at 4 °C with anti- NCX1 rabbit polyclonal antibody (0.5  $\mu g\ mL^{-1}$ , sc-32,881, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), anti-SERCA2 rabbit polyclonal antibody (1.0  $\mu g\ mL^{-1}$ , ab91032, Abcam Plc, Cambridge, UK) and anti- PLB mouse monoclonal antibody (0.15  $\mu g\ mL^{-1}$ , 05–205, Millipore Corporation, Billerica, MA). After washing (10 mM Tris, 100 mM NaCl, and 0.1% Tween 20), membranes were incubated for 2 h at room temperature with the secondary antibodies alkaline phosphatase-conjugated: goat anti-rabbit IgG (0.2  $\mu g\ mL^{-1}$ , sc- 2034, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) or goat anti-mouse IgG (0.34  $\mu g\ mL^{-1}$ , AP308A, Millipore Corporation, Billerica, MA). Membranes were washed and the immunocomplexes were detected using the alkaline phosphatase conjugate substrate kit (Bio-Rad, CA, USA). Integrated optical densities were measured using ImageJ software from the scanned membranes (Abramoff et al., 2004). The results were expressed in arbitrary units (A.U.) of optical density normalized by GAPDH 6C5 (0.2  $\mu g\ mL^{-1}$ , ab8245 Abcam Plc, Cambridge, UK). The GAPDH was chosen as loading control protein as its expression remained unaltered after exercise-training in mice (Rolim et al., 2007; Medeiros et al., 2008). Three different gels (with 3 repetitions of bands for CT and EX) were run for each protein. During each experiment, two identical gels were run and transferred in parallel; one of them was designated for incubation with the specific

antibody for SERCA, NCX, or PLB and the other for loading the control incubation (GAPDH). Then, membranes were simultaneously stained and, after the revelation and optical density measurement, each protein band was normalized with the respective GAPDH band from its parallel membrane.

## 2.6. Statistical analysis

Data are shown as means  $\pm$  SEM or univariate scatterplots. Differences between the CT and EX groups were compared by the unpaired *t*-test. To compare changes in each variable over time, a one-way ANOVA was performed followed by the Tukey and Kramer post-hoc tests. The differences were considered to be significant at  $P < 0.05$ . Data was analyzed using GraphPad InStat 3.00 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1. Biometric characteristics

After 60 days of exercise (EX) and static water (CT), fish from the CT presented  $W_b = 268 \pm 16$  g and  $L_b = 26.2 \pm 0.4$  cm while EX increased both  $W_b$  ( $336 \pm 11$  g) and  $L_b$  ( $28 \pm 0.4$  cm). The RVM did not vary among groups  $CT = 0.073 \pm 0.003\%$  and  $EX = 0.074 \pm 0.002\%$  ( $P > 0.05$ ).

### 3.2. In vitro experiments

Fig. 1 shows the comparison between the twitch tension ( $Tt$ -  $mN\cdot mm^{-2}$ ) and cardiac pumping capacity ( $CPC$ -  $mN\cdot mm^{-2}\cdot min^{-1}$ ) values (mean  $\pm$  SE) of CT and EX and under pre-treatment with the lithium (group + Li) or ryanodine (group + Ryan). Tt values in EX were  $\sim 30\%$  higher than CT between 0.2 and 1.4 Hz ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1A). In EX + Li mean values of Tt were also lower ( $P < 0.05$ ) than those presented in CT + Li in all endured frequencies (0.2–0.8 Hz) (Fig. 1B). In EX + Ryan, Tt decreased ( $P < 0.05$ ) in all frequencies higher than 1.2 Hz in relation to the initial values presented in 0.2 Hz and also reduced the maximum endured frequency (1.8 Hz) when compared to CT + Ryan (2.0 Hz) (Fig. 1C). Higher values of Tt ( $+ 53 - + 43\%$ ,  $P < 0.05$ ) were found in EX + Ryan in comparison to CT + Ryan in the range of frequency between 0.2 and 1.0 Hz (Fig. 1C).

Additionally, EX presented CPC values  $\sim 40\%$  higher ( $P < 0.05$ ) than CT in all stimulation frequencies (Fig. 1D). CT + Li presented higher CPC values between 0.6 and 2.0 Hz in comparison to the initial values found at 0.2 Hz (Fig. 1E). Increments in stimulation frequency did not cause alterations to the CPC in EX + Li (Fig. 1E). Furthermore, the CPC values presented by EX + Li were  $\sim 40\%$  lower ( $P < 0.05$ ) than the CT + Li ones in all frequencies (Fig. 1E). Furthermore, the comparison between the CPC presented by EX + Ryan and CT + Ryan showed significantly higher values ( $\sim 50\%$ ,  $P < 0.05$ ) in EX + Ryan in all ranges of frequency until 1.4 Hz (Fig. 1F).

Fig. 2 shows the values (mean  $\pm$  SE) of the Rate of Peak Tension ( $R_{TPT}$ -  $mN\cdot mm^{-2}\cdot s^{-1}$ ) and Rate of 50% Relaxation ( $R_{TR_{50}}$ -  $mN\cdot mm^{-2}\cdot s^{-1}$ ) of CT and EX and the effects of pre-treatment with ryanodine (group + Ryan) or lithium (group + Li). In both CT and EX (Fig. 2A), the mean values of  $R_{TPT}$  recorded after frequency increments (0.4–2.0 Hz) did not show alterations in comparison to the initial values (0.2 Hz) found in each group ( $P > 0.05$ ). Additionally,  $R_{TPT}$  mean values presented by EX were  $\sim 32\%$  higher ( $P < 0.05$ ) in relation to the CT in all the analyzed ranges of frequency (0.2–2.0 Hz) (Fig. 2A). Under frequency increments, CT + Li presented constant mean  $R_{TPT}$  values until 0.8 Hz, showing decreases between 1.0 and 1.2 Hz compared to the mean value found at 0.2 Hz ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2B). Furthermore, EX + Li presented lower values of  $R_{TPT}$  in comparison to CT + Li ( $\sim - 60\%$ ;  $P < 0.05$ ) in all endured ranges (Fig. 2B). Under

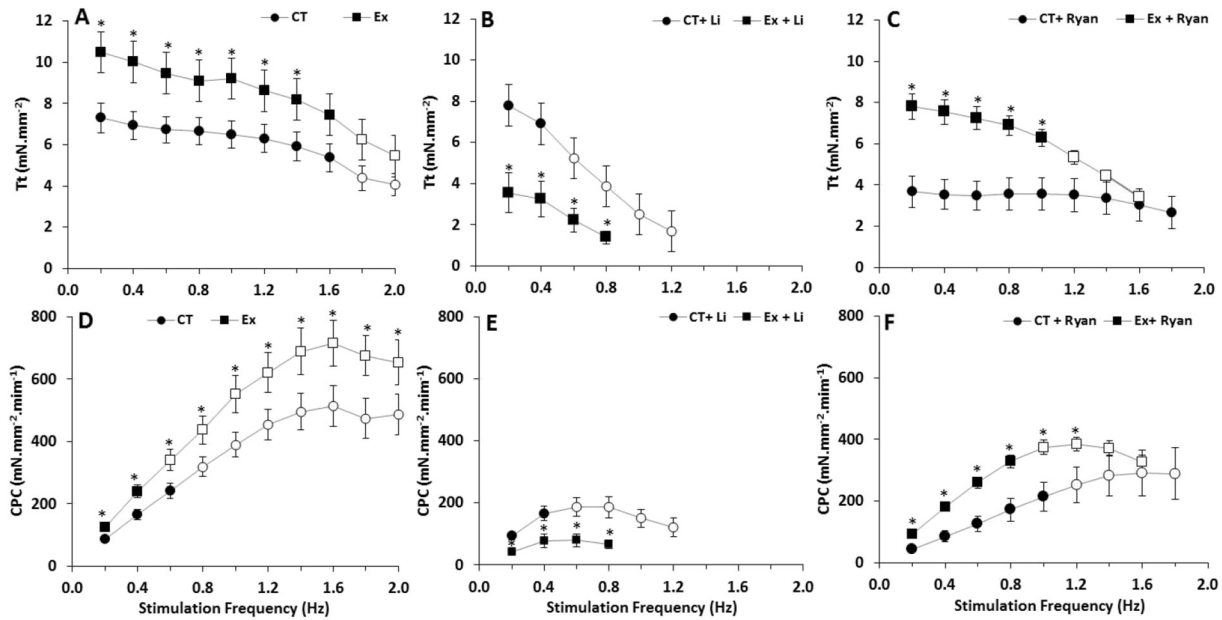


Fig. 1. Comparison between ventricular twitch tension (Tt - mN·mm<sup>-2</sup>) and cardiac pumping capacity (CPC- mN·mm<sup>-2</sup>·min<sup>-1</sup>) of *B. amazonicus* under control condition (CT, n = 10) and after swimming exercise (Ex, n = 10) during increases in stimulation frequency (0.2–2 Hz). Groups were compared at a standard physiological solution (A and D), in solution with Li<sup>+</sup> replacing Na<sup>+</sup> (B and E; n = 10), and in solution with ryanodine (C and F; n = 8). Values are presented as means, vertical bars represents (± SE). Comparisons presenting P < 0.05 were considered statistically different. White markers indicate a statistical difference in relation to the values obtained at 0.2 Hz for the same group. Asterisks (\*) indicate statistical difference at the same stimulation frequency comparing different experimental groups.

frequency increments, CT + Ryan presented constant mean R<sub>TPPT</sub> values under all frequencies (Fig. 2C). However, EX + Ryan (Fig. 2C) presented decreases in R<sub>TPPT</sub> between 1.0 and 1.6 Hz compared to the values found at 0.2 Hz (P < 0.05). EX + Ryan showed higher mean R<sub>TPPT</sub> values than CT + Ryan only between 0.2 and 1.0 Hz (+ 42 to + 34%; P < 0.05), presenting no difference in higher frequencies (Fig. 2C).

In both CT and EX, the R<sub>TR50</sub> mean values did not present variations during frequency increments (0.4–2.0 Hz) compared to the values obtained in each group at 0.2 Hz (Fig. 2D). Moreover, R<sub>TR50</sub> mean values

were not different in CT and EX (Fig. 2D). Additionally, the R<sub>TR50</sub> values in EX + Li were lower than CT + Li (Fig. 2E) in all ranges of frequency (~ - 20%; P < 0.05). Both CT + Ryan and EX + Ryan presented constant mean R<sub>R50</sub> values throughout the whole range of frequencies endured by each group and the comparison between EX + Ryan and CT + Ryan revealed no difference (Fig. 2F) (P > 0.05).

Fig. 3 shows the values (mean ± SE) of twitch tension (Tt-mN·mm<sup>-2</sup>) of CT and EX in comparison with the effects of the lithium (group + Li) or ryanodine (group + Ryan) recorded for each group. In

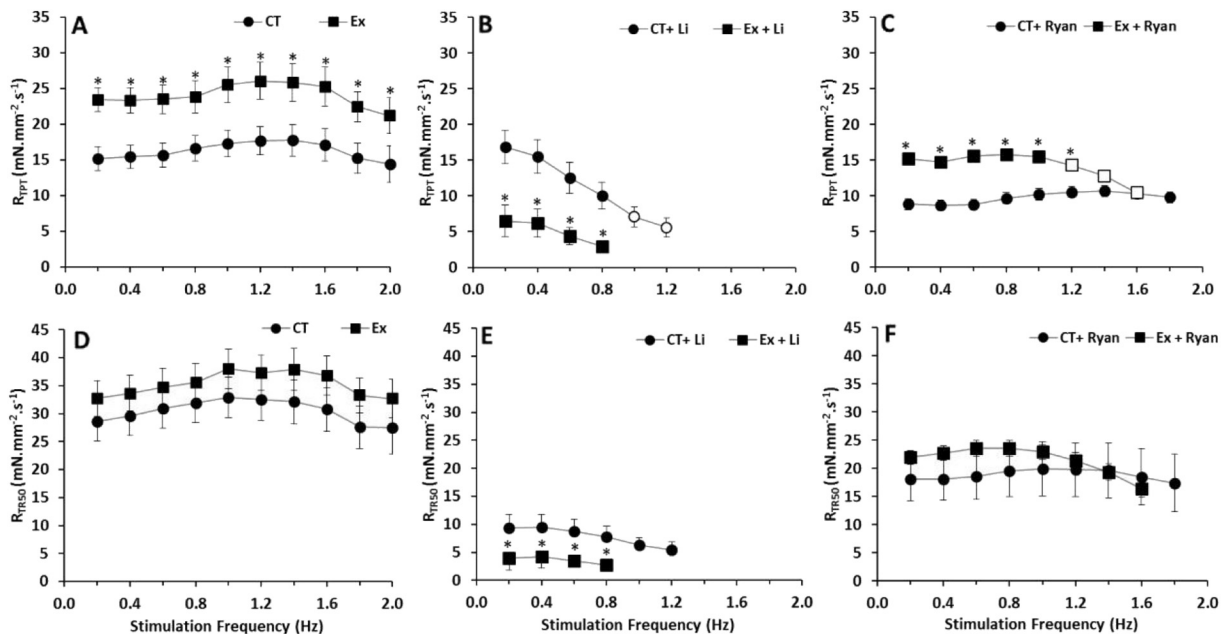
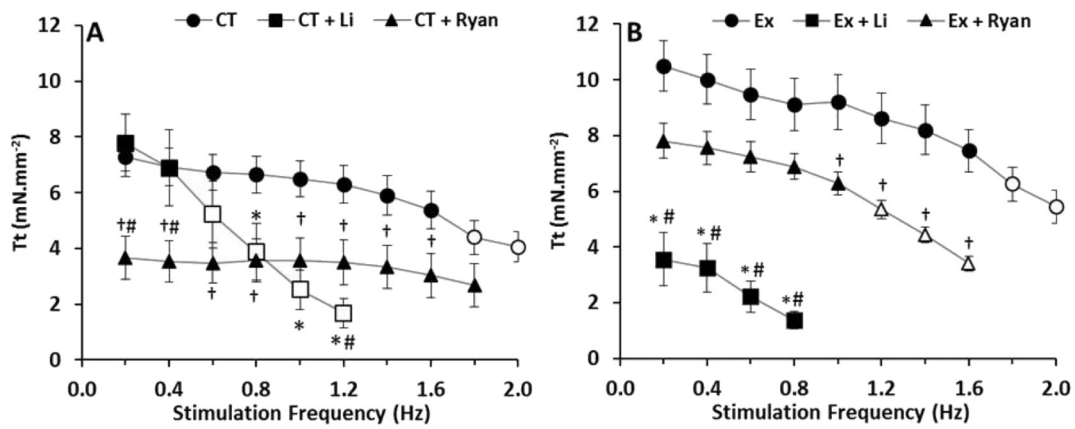


Fig. 2. Comparison between ventricular rates of peak tension (R<sub>TPPT</sub>- mN·mm<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) and rates of 50% relaxation (R<sub>TR50</sub>-mN·mm<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) of *B. amazonicus* under control condition (CT, n = 10) and after swimming exercise (Ex, n = 10) during increases in stimulation frequency (0.2–2 Hz). Groups were compared at a standard physiological solution (A and D), in solution with Li<sup>+</sup> replacing Na<sup>+</sup> (B and E; n = 10), and in solution with ryanodine (C and F; n = 8). Values are presented as means, vertical bars represents (± SE). Comparisons presenting P < 0.05 were considered statistically different. White markers indicate a statistical difference in relation to the values obtained at 0.2 Hz for the same group. Asterisks (\*) indicate statistical difference at the same stimulation frequency comparing different experimental groups.



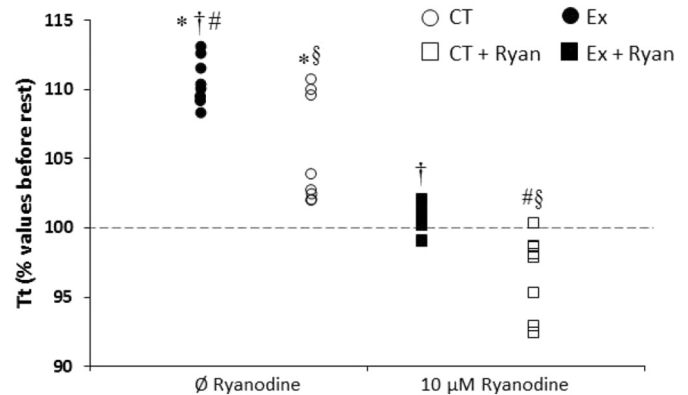


**Fig. 3.** Comparison within groups control (CT,  $n = 10$ , section A) and after swimming exercise (Ex,  $n = 10$ , section B) of ventricular twitch tension ( $T_t - \text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) during increases in stimulation frequency (0.2–2 Hz). Group + Li ( $n = 10$ ) represents the respective group performed in  $\text{Li}^+$  solution and group + Ryan ( $n = 8$ ) represents the group treated with ryanodine. Values are presented as means, vertical bars represents ( $\pm$  SE). Comparisons presenting  $P < 0.05$  were considered statistically different. White markers indicate a statistical difference in relation to the values obtained at 0.2 Hz for the same group. Symbols indicate statistical difference between different treatments at the same stimulation frequency; (\*) comparing groups with each respective group + Li, (†) comparing groups with each respective group + Ryan, (#) comparing each respective group + Li and group + Ryan.

both CT and EX, increments on stimulation frequency caused reductions in the  $T_t$  values between 0.4 and 1.6 Hz in comparison to the values found at 0.2 Hz ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3A and B). The  $T_t$  values found in CT + Li decreased in all the frequencies above 0.4 Hz compared to the values found at 0.2 Hz ( $P < 0.05$ ). CT + Ryan presented decreases in  $T_t$  only at 1.8 Hz and EX + Ryan presented  $T_t$  decreases between 1.2 and 1.6 Hz. The  $T_t$  values found in CT + Li were progressively lower ( $P < 0.05$ ) than the CT in the range of frequencies between 0.6 and 1.2 Hz (–41% at 0.8 Hz, –61% at 1.0 Hz, and –73% at 1.2 Hz). Furthermore, the maximum supported frequency found in CT + Li (1.2 Hz) was lower than CT (2.0 Hz) (Fig. 3A). In CT + Ryan, not only was the maximum supported frequency (1.8 Hz) slightly lower than in CT (2.0 Hz), but also the  $T_t$  mean values were significantly lower ( $\sim$  –50%) than the CT ones between 0.2 and 1.6 Hz (Fig. 3A). CT + Li presented  $\sim$ 50% higher mean  $T_t$  values in comparison to CT + Ryan under 0.2 and 0.4 Hz ( $P < 0.05$ ) and 52% lower values under 1.2 Hz ( $P < 0.05$ ). On the other hand, EX + Li presented a severe reduction in the maximum endured frequency (0.8 Hz) compared to EX (2.0 Hz) and also showed remarkably lower  $T_t$  values ( $P < 0.01$ ) in all endured frequencies (–66% at 0.2 Hz, –68% at 0.4 Hz, –76% at 0.6 Hz, and –84% at 0.8 Hz) (Fig. 3B). The maximum endured frequency in EX + Ryan (1.6 Hz) was also lower than EX (2.0 Hz). Moreover, the  $T_t$  values presented by EX + Ryan were significantly lower than the EX at the frequencies 1.0 (–31%), 1.2 (–37%), 1.4 (–45%) and 1.6 Hz (–54%) (Fig. 3B). EX + Li presented lower ( $P < 0.01$ )  $T_t$  values than EX + Ryan in all endured frequencies (–54% at 0.2 Hz, –57% at 0.4 Hz, –69% at 0.6 Hz, and –79% at 0.8 Hz) (Fig. 3B).

### 3.3. Post-rest contraction

The values of post-rest contraction (PRC - % $T_t$ ) presented by cardiac strips ( $n = 8$ ) of EX and CT at 0.2 Hz after 30 s interruption of continuous stimulation, in standard physiological solution or under pre-treatment with ryanodine, are shown in Fig. 4. Under standard solution, both groups presented increments in PRC values. The mean values presented by EX ( $109 \pm 2\%$ ) were significantly higher than CT ( $104 \pm 1\%$ ) ( $P < 0.05$ ). When treated with ryanodine, no increments in PRC values were observed in both groups. The EX mean values were also higher ( $P < 0.05$ ) than EX + Ryan ( $100 \pm 0.5\%$ ) and CT + Ryan ( $99 \pm 1.6\%$ ). Additionally, CT presented higher values ( $P < 0.05$ ) than CT + Ryan.



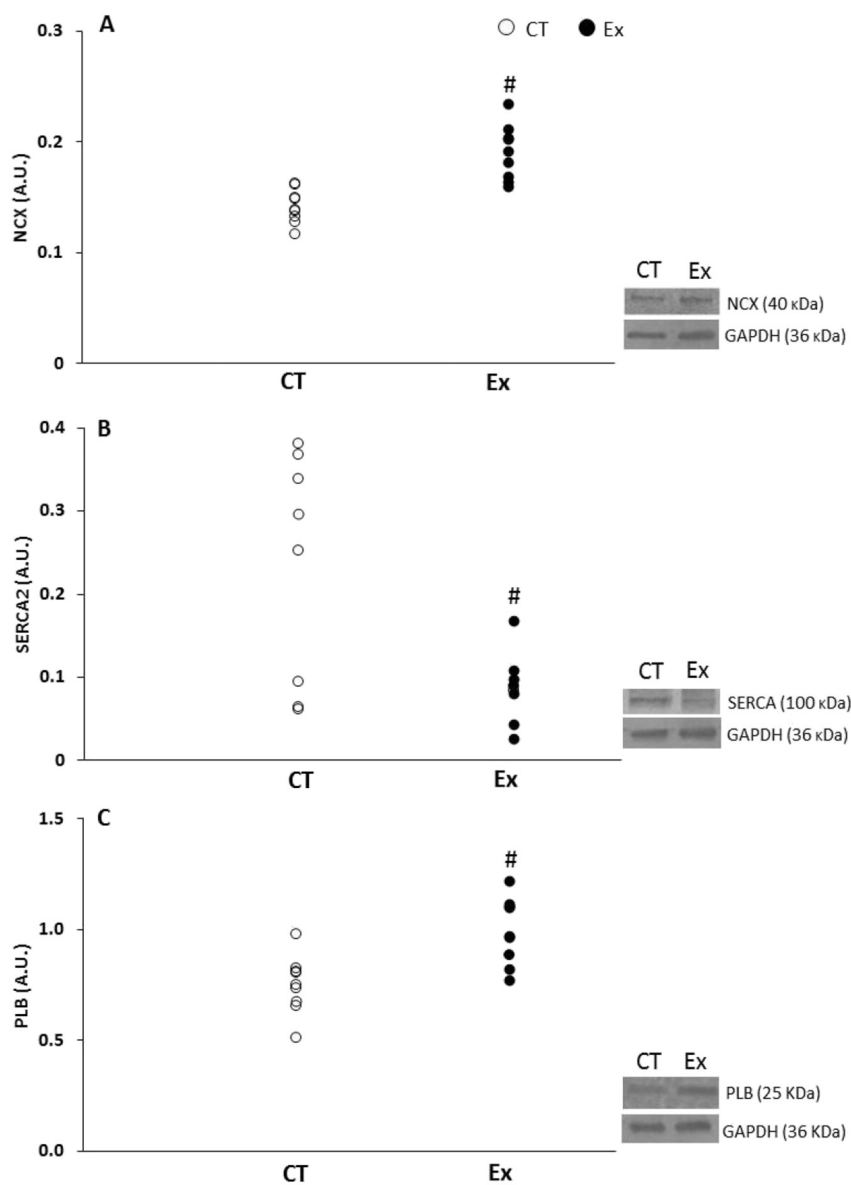
**Fig. 4.** Post-rest Contraction (PRC-% $T_t$ ) from CT ( $n = 8$ ) and EX ( $n = 8$ ) groups with and without ryanodine. The values recorded of the last steady state twitch was normalized with the last twitch prior to the 30s rest (0.2 Hz). Values are presented as univariate scatterplots. Symbols point to statistical differences  $P < 0.05$ , (\*) indicate difference between EX and CT, (†) indicate difference between EX and EX + Ryan, (#) indicate difference between EX and CT + Ryan and § indicate difference between CT and CT + Ryan.

### 3.4. Protein analysis by western blotting

The comparison between levels of the calcium handling proteins NCX, SERCA2 and PLB found in the ventricular muscle of individuals of *B. amazonicus* of EX and CT are presented in Fig. 5. GAPDH levels were not different among groups. EX depicted higher levels ( $P < 0.05$ ) of NCX (+26%) and PLB (+21%) in comparison to CT. Moreover, the levels of SERCA2 were lower (–65%) in EX in comparison to CT ( $P < 0.01$ ).

## 4. Discussion

This was the first study to access the functional roles of NCX and SR in *B. amazonicus* under both conditions: swimming activity in static water (CT) and after submission to 60 days of swimming exercise (EX). Furthermore, this study provided data reporting the exercise-induced modulations on E-C coupling presented by a very active Neotropical fish. In the present study, the improvements in the *in vitro* ventricular contractility, found in EX, were not followed by increases in RVM. In addition, Castro et al. (2013) evaluating the effect of 70 days at moderate ( $0.65 \text{ BL}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and high ( $1.31 \text{ BL}\cdot\text{s}^{-1}$ ) exercise-training on the Atlantic salmon (*Salmo salar*), reported non-statistically significant



**Fig. 5.** Western blotting analysis of NCX (A, n = 9), SERCA2 (B, n = 9) and PLB (C, n = 9) expression levels of *B. amazonicus* from CT and EX groups. Blots from each analysis were normalized using GAPDH as loading control. Values of arbitrary units (A.U) are presented as univariate scatterplots. (#) points to significant differences between the experimental groups ( $P < 0.05$ ).

increases in RVM. Taking this into consideration, data found in the present work indicate that higher values of Tt and CPC can be attributed to improvements in cardiomyocyte  $\text{Ca}^{2+}$  handling and not to an increase in the amount of contractile filaments.

In both groups, the common negative force-frequency relationship, presented by most teleost species studied so far, was seen only in frequencies up to 1.6 Hz (96 bpm). According to Monteiro et al. (2013), the heart frequency ( $f_H$ ) of matrinxã (accessed *in vivo* under normoxia) was around 65 bpm ( $\sim 1.1$  Hz). Unfortunately, no *in vivo* data regarding the range of  $f_H$  presented by this species under exercise training is currently available. However, the present results show evidence of the dynamic  $\text{Ca}^{2+}$  handling, as well the great capacity of mechanical restitution of matrinxã cardiomyocytes under higher stimulation frequencies.

The ameliorated contraction dynamics, shown by the overall higher values of  $R_{\text{TPT}}$ , can also highlight the myocyte enhanced ability to manage  $\text{Ca}^{2+}$  after exercise training. Interestingly, no differences in the  $R_{\text{TR50}}$  within the frequency increments in each group, or between the different groups, were observed. The lack of alterations in  $R_{\text{TR50}}$  can indicate that myocyte relaxation in *B. amazonicus* presented a constant optimal  $R_{\text{TR50}}$  despite the intensity of stimulation frequency or Tt values ( $\sim 39 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Since higher values of Tt were found in EX, it

could be suggested that this group is dealing with a higher concentration of  $[\text{Ca}^{2+}]$  influx during contractions. Thus, the maintenance of the constant  $R_{\text{TR50}}$  values was made possible by the higher expression of NCX and/or SERCA2 activity, provided that ryanodine reduced  $R_{\text{TR50}}$  values in EX.

The reduced relaxation dynamics caused by  $\text{Li}^+$  solution, as shown by the higher values of  $R_{\text{TR50}}$ , was a predictable result as it is well known that NCX is mainly responsible for  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion during the relaxation process in fish myocytes (Hove-Madsen and Tort, 2001; Vornanen et al., 2002; Bers, 2008; Imbert-Auvray et al., 2013). Furthermore, the greatest impact of lithium on relaxation dynamics found in both EX and CT confirms the essential role of NCX during  $\text{Ca}^{2+}$  efflux in matrinxã. Moreover, the highest  $R_{\text{TR50}}$  values found in EX during the SR function block can be also explained by the increased expression of NCX in EX, which could promote an efficient  $\text{Ca}^{2+}$  efflux even without an effective participation of SR during relaxation.

However, also during the SR block, the EX group presented higher Tt, CPC and  $R_{\text{TPT}}$  values than CT in a wide range of stimulation frequencies (0.2–1.0 Hz) suggesting that the enhanced contractility found in EX may be attributed to improvements in  $\text{Ca}^{2+}$  influx through NCX and/or LTCCs. In many fish species,  $\text{Ca}^{2+}$  influx *via* LTCCs is the major source during myocardial contraction (Vornanen, 1997; Vornanen,

1998) and, although their partial role was not directly investigated in the present work, it could be assumed that a higher expression or activity of these channels could also be responsible for the contractile improvements driven by exercise.

Furthermore, the functional inhibition NCX in EX ventricular preparations decreased Tt, CPC and  $R_{TPT}$  values in comparison to CT even at very low stimulation frequencies (0.2–0.8 Hz). These results, followed by the higher NCX expression rates in EX, can lead to the hypothesis that reverse mode NCX could present a role for the contractile tension development in exercise-trained animals. Additionally, the role of NCX for  $Ca^{2+}$  influx or CICR activation during cardiac contraction of fish is not yet fully understood and may also vary among species (Larbig et al., 2010). It was shown that reverse mode NCX highly contributes to  $Ca^{2+}$  influx in some fish species, for example 30–50% in crucian carp (*Carassius carassius*) and 70% in burbot (*Lota lota*) (Vornanen, 1999; Shiels et al., 2006). Hove-Madsen et al. (2003) also described that in rainbow trout atrial myocytes, the reverse mode NCX greatly contributes to the CICR. In view of this, once great SR importance was found for the ventricular contraction of *matrinxã*, it can be also speculated that the NCX inhibition could lead to an insufficient amount of  $Ca^{2+}$  for CICR activation in exercised-trained fish.

However, as the NCX inhibition method adopted in the present work,  $Li^+$  replacing  $Na^+$  in the physiological solution, was not specific for inhibiting the reverse mode NCX, the stronger impairments of  $Li^+$  solution on Tt, CPC and  $R_{TPT}$  can also be attributed to an increase in cytosolic  $[Ca^{2+}]_i$ , which could alter the intracellular electrochemical gradient and possibly decrease  $Ca^{2+}$  influx through the LTCCs (Janvier and Boyett, 1996; Vassalle and Li, 2004). In this regard, further analysis using specific inhibitors of reverse mode NCX and LTCCs are needed to elucidate the differential relevance of these components in exercise-trained fish.

In CT animals, the functional inhibition SR decreased the absolute tension production in ~50% of the majority of stimulation frequencies. This tension decrease was greater than that reported for species of high swimming performance such as Pacific mackerel (~20%) and tunas (30–40%) (Keen et al., 1992; Shiels et al., 1999; Shiels and Farrell, 2000). This result also corroborates the current hypothesis that vigorous swimming species present higher relative SR contribution in cardiac contraction (Keen et al., 1992; Aho and Vornanen, 1999; Shiels et al., 1999; Rivaroli et al., 2006; Imbert-Auvray et al., 2013).

However, in EX, decreases in Tt led by ryanodine treatment were absent under lower stimulation frequencies (0.2–0.8 Hz), but significant (31 to 54%,  $P < 0.05$ ) between 1.0 and 1.6 Hz. Since, after the SR block, the sarcolemmal components are the only remaining  $Ca^{2+}$  donors, it is likely that the highest Tt values obtained in EX under subphysiological stimulation frequencies were caused by the NCX reverse mode or the LTCCs. Conversely, under stimulation frequencies closer to *in vivo*  $f_H$  (1.1 Hz; Monteiro et al., 2013), the actual role of SR could be accessed. However, as the decrease in Tt led by ryanodine was stable in CT, it can be proposed that the relative role of SR as a  $Ca^{2+}$  donor was frequency-dependent on EX. These results can point to a modulation on the SR reliance according to  $f_H$  presented by *matrinxã* under exercise training.

Despite the lack of data about the functional cardiac contractility in exercised fish, a similar SR pattern was described for common sole (*Solea solea*) after cold acclimation (12 and 18 °C). In this species, ryanodine progressively decreased the Tt of ventricular preparations, from ~15% at 0.2 Hz to ~50% at 1.2 and 1.6 Hz, indicating an enhanced reliance on SR during higher frequencies (Imbert-Auvray et al., 2013). These authors attributed this adjustment to differences in the expression/activity of RyR (Vornanen, 2006) and SERCA2 (Landeira-Fernandez et al., 2004).

Moreover, Castro et al. (2013) analyzed the gene transcription of LTCCs, RyR, SERCA2 and calsequestrin (a  $Ca^{2+}$  handling protein found inside SR) in the heart of Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exercise, reporting significant enhances only in L-channels and calsequestrin

expressions. The authors proposed that, in this species, exercise led to improvements in sarcolemmal  $Ca^{2+}$  influx via increases in LTCCs, as well as improvements in SR  $Ca^{2+}$  management.

In the present study, however, the decreased expression rates of SERCA2 followed by increased rates of PLB can also indicate a differential modulation on SERCA2 led by exercise training in *matrinxã*. As mentioned in previous sections, PLB is a phosphoprotein associated to SR that regulates SERCA2 activity. When in its dephosphorylated state, PLB inhibits SERCA2 activity, although, once phosphorylated by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII) and other paths, PLB relieves this inhibition and increases SERCA2 activity (Cerra and Imbrogno, 2011). The PLB phosphorylation via CaMKII is achieved during an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (Kranias and Hajjar, 2012).

Given the inhibitory aspect of PLB on SERCA2, in mammal cardiomyocytes, increases in the PLB expression in relation to SERCA2 (higher PLB/SERCA2 ratio) are usually associated with decreases in  $Ca^{2+}$  affinity of SERCA2 and deficiency in SR  $Ca^{2+}$  store (Haghighi et al., 2003), leading to prolonged relaxation time and a reduction in contractility (Kadambi et al., 1996; Meyer et al., 1999). However, despite the higher PLB/SERCA2 rate, improvements in Tt and  $R_{TPT}$ , as well as no alterations to  $T_{TR50}$  were described in EX.

As previously discussed, the  $Ca^{2+}$  influx through NCX or LTCCs became essential for the development of the higher Tt values, therefore, promoting higher  $[Ca^{2+}]_i$  during contractions. Since higher  $[Ca^{2+}]_i$  influx concentrations can activate CaMKII, thus releasing the inhibition promoted by PLB, it can be suggested that a high PLB/SERCA2 rate is a modulation that promotes the SERCA2 activation at higher levels of  $[Ca^{2+}]_i$ . Additionally, the evaluation of PRC describes the SR's full capacity of  $Ca^{2+}$  accumulation (Holubarsch, 2002). Both CT and EX presented PRC potentiation after a 30s pause, a result that was fully inhibited by the pretreatment with ryanodine. The comparison between the PRC values of CT and EX revealed that exercise training promoted an elevation on SR capacity for  $Ca^{2+}$  loading, indicating that the elevated PLB/SERCA2 ratio did not affect the SR capacity of  $Ca^{2+}$  accumulation.

In conclusion, this was the first study to functionally analyze the effects of swimming-induced exercise on fish cardiac E-C. The exercise-training induced remarkable improvements in ventricular contractility of *matrinxã*, promoting increases in tension generation, cardiac pumping capacity, as well as contractile and relaxation dynamics. The NCX was shown to be essential for relaxation, but in EX, the NCX inhibition also caused a more significant decrease in all contractile parameters. Moreover, the results indicate that *matrinxã* in both sedentary and exercised conditions rely highly on SR during ventricular contractions. However, in CT animals, the SR contribution was stable (50%) in all range frequencies while in EX animals, the SR contribution (31–54%) was evident only at higher frequencies. These improvements were associated with the higher expression of NCX and PLB and lower expression of SERCA2. Although more studies are needed to clarify the partial roles of NCX and LTCCs as  $Ca^{2+}$  donors, our data revealed that *matrinxã* presents a differential modulation of E-C coupling after exercise training, enhancing the relevance of the sarcolemmal components in under lower pace frequencies, as well as improving the SR relevance under higher frequencies.

## Acknowledgments

This study was supported by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP, Proc. #13/17410-7) and the National Institute for Science and Technology in Comparative Physiology (INCT-FisC) (Proc. #08/57712-4). We are grateful to Dr. Monica Jones Costa, Dr. Cléo Alcantara Costa Leite and Dr. Gilberto Eiji Shigemoto for their valuable contributions and to Mr. Angelo Canevarolo for the technical assistance.

## Ethics in animal experimentation

This study was conducted in accordance with the Brazilian legislation (Law #11.794, October 8, 2008). All capture, holding and experimental techniques were performed under the approval of the Federal University of São Carlos Committee of Ethics in Animal Experimentation (CEUA - approval #037/2013) and in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals published by National Institutes of Health and the ethical guidelines.

## References

- Abramoff, M.D., Magalhães, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophoton. Int.* 11, 36–42.
- Aho, E., Vornanen, M., 1999. Contractile properties of atrial and ventricular myocardium of the heart of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effects of thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* 2677, 2663–2677.
- Almeida-Val, V.M.F. de, Gomes, A.R.C., Lopes, N.P., 2005. Fish physiology: the physiology of tropical fishes. In: *The Physiology of Tropical Fishes*, pp. 5. [http://dx.doi.org/10.1016/S1546-5098\(05\)21008-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1546-5098(05)21008-7).
- Ballantyne, J.S., Robinson, J.W., 2011. Encyclopedia of Fish Physiology, Encyclopedia of Fish Physiology. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00043-5>.
- Bers, D.M., 2000. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ. Res.* 87, 275–281.
- Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415, 198–205. <http://dx.doi.org/10.1038/415198a>.
- Bers, D.M., 2008. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 23–49. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455>.
- Bonazzola, P., Egido, F.D., Marengo, E., Savio-Galimberti, E., Ponce-Hornos, J.E., 2002. Lithium and KB-R7943 effects on mechanic and energetics of rat heart muscle. *Acta Physiol. Scand.* 176, 1–11.
- Bushnell, P.G., Jones, D.R., 1994. Cardiovascular and respiratory physiology of tuna: adaptations for support of exceptionally high metabolic rates. *Environ. Biol. Fish* 40, 303–318. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00002519>.
- Castro, V., Grisdale-Helland, B., Helland, S.J., Torgersen, J., Kristensen, T., Claireaux, G., Farrell, A.P., Takle, H., 2013. Cardiac molecular-acclimation mechanisms in response to swimming-induced exercise in Atlantic salmon. *PLoS One* 8, e55056. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055056>.
- Cerra, M.C., Imbrogno, S., 2011. Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. *Acta Physiol (Oxford)* 9–25. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02389.x>.
- Cheek, T.R., Berridge, M.J., Moreton, R.B., Stauder, K.A., Murawsky, M.M., Bootman, M.D., 1994. Quantal  $Ca^{2+}$  mobilization by ryanodine receptors is due to all-or-none release from functionally discrete intracellular stores. *Biochem. J.* 301 (Pt 3), 879–883.
- Davison, W., 1997. The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 117, 67–75.
- Eisner, D., Bode, E., Venetucci, L., Trafford, A., 2012. Calcium flux balance in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.017>.
- Farrell, A.P., Johansen, J.A., Suarez, R.K., 1991. Effects of exercise-training on cardiac performance and muscle enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* 9, 303–312. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02265151>.
- Ferreira, M.S., Oliveira, A.M. De, Val, A.L., 2010. Velocidade crítica de natação (Ucrit) de matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exposição à hipóxia. *Acta Amaz* 40, 699–704. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672010000400009>.
- Ferreira, M.S., Aride, P.H.R., Silva, M. de N.P. da, Val, A.L., 2013. Efeito da quantidade de proteína na dieta e treinamento físico sobre parâmetros fisiológicos e zootécnicos de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Günther 1869). *Acta Amaz* 43, 439–446. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672013000400005>.
- Frasca-Scorvo, C.M.D., Carneiro, D.J., Malheiros, E.B., 2001. Comportamento alimentar do matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. *Bol. Inst. Pesca* 27, 1–5. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982002000500001>.
- Gallaugh, P.E., Thorarensen, H., Kiessling, A., Farrell, A.P., 2001. Effects of high intensity exercise training on cardiovascular function, oxygen uptake, internal oxygen transport and osmotic balance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during critical speed swimming. *J. Exp. Biol.* 204, 2861–2872.
- Galli, G.L.J., Lipnick, M.S., Shiels, H.A., Block, B.A., 2011. Temperature effects on  $Ca^{2+}$  cycling in scomidrid cardiomyocytes: a phylogenetic comparison. *J. Exp. Biol.* 214, 1068–1076. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.048231>.
- Gensac, E., Martinez, J.M., Vantrepotte, V., Anthony, E.J., 2016. Seasonal and inter-annual dynamics of suspended sediment at the mouth of the Amazon river: the role of continental and oceanic forcing, and implications for coastal geomorphology and mud bank formation. *Cont. Shelf Res.* 118, 49–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csr.2016.02.009>.
- Gesser, H., 1996. Cardiac force-interval relationship, adrenaline and sarcoplasmic reticulum in rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B.* 166, 278–285.
- Gillis, T.E., Tibbits, G.F., 2002. Beating the cold: the functional evolution of troponin C in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 132, 763–772.
- Guimarães, S.F., Storti-Filho, A., 2003. Preliminary observations on the effect of sudden changes of temperature on survival of young matrinxã (*Brycon cephalus*) under laboratory conditions. *Acta Amaz*.
- Hackbarth, A., Moraes, G., 2006. Biochemical responses of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) after sustained swimming. *Aquac. Res.* 37, 1070–1078. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01530.x>.
- Haghighi, K., Kolokathis, F., Pater, L., Lynch, R.A., Asahi, M., Gramolini, A.O., Fan, G.C., Tsiaras, D., Hahn, H.S., Adamopoulos, S., Liggett, S.B., Dorn, G.W., MacLennan, D.H., Kremastinos, D.T., Kranias, E.G., 2003. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J. Clin. Invest.* 111, 869–876. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI200317892>.
- Holubarsch, C.J.F., 2002. Mechanics and Energetics of the Myocardium. Springer, US. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-0879-3>.
- Hove-Madsen, L., Tort, L., 2001. Characterization of the relationship between  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  exchange rate and cytosolic calcium in trout cardiac myocytes. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 441, 701–708. <http://dx.doi.org/10.1007/s004240000470>.
- Hove-Madsen, L., Llach, A., Tort, L., 1998. Quantification of  $Ca^{2+}$  uptake in the sarcoplasmic reticulum of trout ventricular myocytes. *Am. Phys. Soc.* 23, 2070–2080.
- Hove-Madsen, L., Llach, A., Tibbits, G.F., Tort, L., 2003. Triggering of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release and contraction by reverse mode  $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchange in trout atrial myocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R1330–9. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00404.2002>.
- Imbert-Auvray, N., Mercier, C., Huet, V., Bois, P., 2013. Sarcoplasmic reticulum: a key factor in cardiac contractility of sea bass *Dicentrarchus labrax* and common sole *Solea solea* during thermal acclimations. *J. Comp. Physiol. B.* 183, 477–489. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-012-0733-0>.
- Janvier, N.C., Boyett, M.R., 1996. The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. *Circ. Res.* 32, 69–84.
- Kadambi, V.J., Ponniah, S., Harrer, J.M., Hoit, B.D., Dorn, G.W., Walsh, R.A., Kranias, E.G., 1996. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 97, 533–539. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI118446>.
- Keen, J.E., Farrell, A.P., Tibbits, G.F., Brill, R.W., 1992. Cardiac physiology in tunas. 2. Effect of ryanodine, calcium, and adrenaline on force frequency relationships in atrial strips from skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Can. J. Zool. Can. Zool.* 70, 1211–1217.
- Kieffer, J.D., 2010. Perspective-Exercise in fish: 50 + years and going strong. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 156, 163–168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.02.009>.
- Kranias, E.G., Hajjar, R.J., 2012. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ. Res.* 110, 1646–1660. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.259754>.
- Landeira-Fernandez, A.M., Morrisette, J.M., Blank, J.M., Block, B.A., 2004. Temperature dependence of the  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA2) in the ventricles of tuna and mackerel. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R398–R404. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00392.2003>.
- Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., Hamilton, S.L., 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003996. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a003996>.
- Larbig, R., Torres, N., Bridge, J.H.B., Goldhaber, J.I., Philipson, K.D., 2010. Activation of reverse  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  exchange by the  $Na^{+}$  current augments the cardiac  $Ca^{2+}$  transient: evidence from NCX knockout mice. *J. Physiol.* 588, 3267–3276. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187708>.
- Layland, J., Young, I.S., Altringham, J.D., 1995. The length dependence of work production in rat papillary muscles in vitro. *J. Exp. Biol.* 198, 2491–2499.
- Medeiros, A., Rolim, N.P.L., Oliveira, R.S.F., Rosa, K.T., Mattos, K.C., Casarini, D.E., Irigoyen, M.C., Krieger, E.M., Krieger, J.E., Negrao, C.E., Brum, P.C., 2008. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. *J. Appl. Physiol.* 104, 103–109. <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00493.2007>.
- Meyer, M., Bluhm, W.F., He, H., Post, S.R., Giordano, F.J., Lew, W.Y., Dillmann, W.H., 1999. Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship. *Am. J. Physiol.* 276, H779–H785.
- Monteiro, D.A., Thomaz, J.M., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2013. Cardiorespiratory responses to graded hypoxia in the neotropical fish matrinxã (*Brycon amazonicus*) and traíra (*Hoplias malabaricus*) after waterborne or trophic exposure to inorganic mercury. *Aquat. Toxicol.* 140–141, 346–355. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.011>.
- Monteiro, D.A., Kalinin, A.L., Selistre-De-Araujo, H.S., Vasconcelos, E.S., Rantin, F.T., 2016. Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein from *Rhinocerosophis alternatus* snake venom promotes positive inotropism and chronotropism in fish heart. *Toxicol.* 110, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicol.2015.11.012>.
- Nakauth, A.C.S.S., Villacorta-Correa, M.A., Figueiredo, M.R., Bernardino, G., França, J.M., Nakauth, A.C.S.S., Villacorta-Correa, M.A., Figueiredo, M.R., Bernardino, G., França, J.M., 2016. Embryonic and larval development of *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829). *Braz. J. Biol.* 76, 109–116. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.13914>.
- Rivaroli, L., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish: Curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae), and trahira, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 145, 322–327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.001>.
- Rocha, M.L., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2007. Importance of the sarcoplasmic reticulum and adrenergic stimulation on the cardiac contractility of the neotropical teleost *Synbranchus marmoratus* under different thermal conditions. *J. Comp. Physiol. B.* 177, 713–721. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-007-0166-3>.
- Rolim, N.P., Medeiros, A., Rosa, K.T., Mattos, K.C., Irigoyen, M.C., Krieger, E.M., Krieger, J.E., Negrao, C.E., Brum, P.C., 2007. Exercise training improves the net balance of cardiac  $Ca^{2+}$  handling protein expression in heart failure. *Physiol. Genomics* 29, 246–252. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00188.2006>.



- Sanger, A.M., Potscher, U., 2000. Endurance exercise training affects fast white axial muscle in the Cyprinid Species *Chalcalburnus Chalcoides Mento* (Agassiz, 1832), Cyprinidae, Teleostei. *Basic Appl. Myol.* 10, 297–300.
- Savio-Galimberti, E., Ponce-Hornos, J.E., 2006. Effects of caffeine, verapamil, lithium, and KB-R7943 on mechanics and energetics of rat myocardial bigeminias. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H613–H623. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01219.2004>.
- Shiels, H.A., Farrell, A.P., 2000. The effect of ryanodine on isometric tension development in isolated ventricular trabeculae from Pacific mackerel (*Scomber japonicus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 125, 331–341.
- Shiels, H.A., Galli, G.L.J., 2014. The sarcoplasmic reticulum and the evolution of the vertebrate heart. *Physiology* 29, 456–469. <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00015.2014>.
- Shiels, H.A., Sitsapesan, R., 2015. Is there something fishy about the regulation of the ryanodine receptor in the fish heart? *Exp. Physiol.* 100 (12), 1412–1420. <http://dx.doi.org/10.1113/EP085136>.
- Shiels, H.A., Freund, E.V., Farrell, A.P., Block, B.A., 1999. The sarcoplasmic reticulum plays a major role in isometric contraction in atrial muscle of yellowfin tuna. *J. Exp. Biol.* 890, 881–890.
- Shiels, H.A., Paajanen, V., Vornanen, M., 2006. Sarcolemmal ion currents and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  content in ventricular myocytes from the cold stenothermic fish, the burbot (*Lota lota*). *J. Exp. Biol.* 209, 3091–3100. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.02321>.
- Smith, G.L., Allen, D.G., 1988. Effects of metabolic blockade on intracellular calcium concentration in isolated ferret ventricular muscle. *Circ. Res.* 62, 1223–1236.
- Vassalle, M., Li, C.I., 2004. Calcium overload and cardiac function. *J. Biomed. Sci.* 11, 542–565. <http://dx.doi.org/10.1159/000079666>.
- Vornanen, M., 1997. Sarcolemmal Ca influx through L-type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 272, R1432–R1440.
- Vornanen, M., 1998. L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in fish cardiac myocytes: effects of thermal acclimation and beta-adrenergic stimulation. *J. Exp. Biol.* 20, 533–547.
- Vornanen, M., 1999.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange current in ventricular myocytes of fish heart: contribution to sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *J. Exp. Biol.* 202, 1763–1775.
- Vornanen, M., 2006. Temperature and  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of [3H]ryanodine binding in the burbot (*Lota lota* L.) heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R345–R351. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00443.2005>.
- Vornanen, M., Shiels, H.A., Farrell, A.P., 2002. Plasticity of excitation - contraction coupling in fish cardiac myocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 132, 827–846.