

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

LUCIANO RIVAROLI

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA DO TELEÓSTEO  
NEOTROPICAL MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*: UMA ANÁLISE  
MATEMÁTICA E BIOMOLECULAR**

**SÃO CARLOS  
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**LUCIANO RIVAROLI**

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA DO TELEÓSTEO  
NEOTROPICAL MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*: UMA ANÁLISE  
MATEMÁTICA E BIOMOLECULAR**

**Tese apresentada ao Programa  
Interinstitucional de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas (PIPGCF UFSCar-  
UNESP), para obtenção do título de  
Doutor em Ciências**

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

**SÃO CARLOS  
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R618af

Rivaroli, Luciano.

Avaliação da função cardíaca do teleósteo neotropical matrinxã, *Brycon amazonicus* : uma análise matemática e biomolecular / Luciano Rivaroli. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

104 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Coração - fisiologia. 2. Tensão isométrica. 3. Retículo sarcoplasmático. 4. SERCA2a. 5. Fosfolambano. 6. Função cardíaca. I. Título.

CDD: 612.17 (20<sup>a</sup>)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Tese de Luciano Rivaroli

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Kalinin..... *Ana Lucia Kalinin*

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo..... *Luiz Henrique Florindo*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Couto Davel..... *Ana Paula Couto Davel*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Jones Costa..... *Mônica Jones Costa*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kênia Cardoso Bicego..... *Kenia Cardoso Bicego*

*Dedico essa tese aos meus pais, Joel Rivaroli e Maria Eliza Rivaroli, que me ensinaram a ser perseverante e enxergar nas dificuldades as oportunidades para o crescimento, fundamentais para a elaboração deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Ana Lúcia Kalinin, pela oportunidade de executar esse trabalho, por compreender meu espírito complicado e ávido de inovações, pela credibilidade às minhas ideias, pela paciência com as minhas trapalhadas e principalmente, pelo amor e carinho nesses anos de convivência.

À Profa. Luciana Venturini Rossoni, que me recebeu tão bem em seu laboratório, ofereceu sua tão valiosa amizade e utilizou todos os recursos e ideias possíveis e imagináveis para a execução desse trabalho.

À minha esposa Iara, pelo amor, apoio, compreensão por minha falta de paciência e pela fundamental ajuda com as análises filogenéticas e com a confecção dessa tese.

Aos meus inseparáveis amigos Zé e Talento, que sofreram e me incentivaram nas angústias, celebraram comigo as conquistas da tese e me ajudaram com as figuras e com a biologia do matrinxã.

Aos meus companheiros e amigos das Véia Loka, Hulquinho, Binho, Bruno, Júlio e mais recentemente Nathan, que me trouxeram a alegria do Rock and Roll e ajudaram a manter a saúde mental em tantos momentos difíceis.

Às minhas amigas queridas Diana, Juliana, Danosa e Mariana, que proporcionaram uma convivência tão divertida, étlica e ao mesmo tempo tão questionadora dos fatos.

Aos meus companheiros de laboratório, André, Samuel, Vô, e Mr. Ângelo, que sempre que puderam se dispuseram a me ajudar.

Aos meus companheiros e amigos de Western Blot, Ana Paula, Gisele, Camis, Leo e Hildi pelo apoio e incentivo nas inúmeras tentativas.

Aos meus amigos de São Carlos, Graziela, Ivoneide, Sadao, Bruna, Letícia, que me acolheram e compartilharam tantos momentos felizes desse período.

Aos meus amigos Iola, Bjorn, José Batista e Fernando Costa que me incentivaram a terminar essa tese para alcançar cumes mais altos na pesquisa científica.

Ao Prof. Fernando Otávio Coelho, pelo apoio para a finalização deste trabalho e pelas explicações sobre o significado mecânico da contração.

Ao Professor Francisco Tadeu Rantin, pela agradável convivência e pelo exemplo de vida como empreendedor na pesquisa da fisiologia comparada.

À Tecumseh, que gentilmente cedeu o gelo seco para o transporte dos corações para São Paulo.

Ao CNPq pelo fundamental apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

À todos os meus alunos, que fazem parte da minha força motivacional na pesquisa científica.

*“I have slightly expanded certain parts of this paper since reading it. It has therefore probably lost any unity which it may once have possessed. It will be criticized for its undue and unpleasant emphasis on certain topics. This is necessary if people are to be induced to think about them, and it is the whole business of a university teacher to induce people to think.”*

*J. B. S. Haldane, “Daedalus of Science and the future, a paper read to the heretics.”*

*Cambridge on February 4<sup>th</sup>, 1923*

## RESUMO

A contratilidade do miocárdio ventricular do teleósteo matrinxã, *Brycon amazonicus*, foi analisada com dados de experimentos prévios, realizados com preparações isométricas multicelulares e protocolos de efeito do tempo e de relação força-frequência, com e sem exposição ao alcalóide rianodina, bloqueador dos canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS). Nesse estudo foram utilizadas diferentes abordagens metodológicas de tratamento de dados, como o estresse isométrico (EI,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), a partir do qual foi possível identificar a sensibilidade do miocárdio à rianodina, com contribuição majoritária do  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do RS. A utilização dos tempos para o pico de tensão e para metade do relaxamento (TPT e THR, ms), se mostraram ineficazes para avaliar o desempenho da contração e relaxamento no experimento do efeito do tempo. Novas abordagens na análise dos dados, como a taxa de contração e taxa inicial de relaxamento (TC e TIR,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) demonstraram explicitamente o comprometimento do miocárdio durante a exposição à rianodina. O efeito escada negativo, característico da relação força-frequência de teleósteos foi evidenciado pelo EI. As taxas máximas de contração e de relaxamento (TMC e TMR,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e as taxas médias de contração e de relaxamento (TMedC e TMedR,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) além de demonstrarem o comprometimento da contratilidade durante exposição à rianodina, indicaram que existe um menor comprometimento da tensão durante elevação da frequência, quando comparados aos valores de TPT e THR. A TMedC e a TMedR apresentaram resultados relacionados a uma frequência cardíaca com maior possibilidade de ajustes do que a TMC e a TMR, provavelmente por considerarem o conjunto de variação das taxas instantâneas da contração e não somente um único ponto da curva. A capacidade de bombeamento cardíaco (CBC,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ) mostrou que a faixa ótima de frequência para contração isométrica é estreita e que o miocárdio da espécie deve estar trabalhando no limiar na condição de repouso. As análises da integral da tensão isométrica (ITI,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}$ ), e da integral da tensão isométrica por minuto (ITIPM,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}$ ) mostraram-se inapropriadas para a avaliação da contratilidade cardíaca pelo modo como foram calculadas, uma vez que geraram interpretações incoerentes, provavelmente por utilizarem informações da curva de contração irrelevantes para a preparação isométrica. O índice de contratilidade (IC,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) criado nesse trabalho, sugere que o miocárdio da espécie é mais sensível às elevações de frequência. Por outro lado, o índice de contratilidade por minuto (ICPM,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) mostrou que a faixa ótima de frequências para a contração cardíaca de *B. amazonicus* pode ser mais ampla, o que permitiria uma reserva de desempenho, assim como observado para outros teleósteos. A expressão das proteínas SERCA2a e fosfolambano (PLB) foram analisadas pela técnica de *Western Blot* e sua expressão reforçaram os achados de funcionalidade do RS. A análise comparativa dessas proteínas utilizando sequências de aminoácidos disponíveis em bancos de dados públicos (GenBank e UniProt) revelou os níveis de similaridade entre a SERCA2a e PLB de peixes e mamíferos, reforçando os achados dos estudos com *Western Blot*. Em conjunto, os dados sugerem que o miocárdio do *B. amazonicus*, apresenta uma nítida dependência do RS em frequências fisiológicas e, apesar de exibir um claro padrão escada negativo, deve apresentar uma reserva de desempenho para frequências suprafisiológicas.

**Palavras chaves:** Integral da tensão isométrica. Retículo sarcoplasmático. SERCA2a. Fosfolambano. *Western Blot*. Análise de similaridade molecular.

## ABSTRACT

The ventricular myocardial contractility of the matrixã teleost, *Brycon amazonicus*, was analysed in previous experimentation with isometric multicellular preparations, in time effect and force-frequency relationship experiments, with and without exposure to the alkaloid ryanodine, a sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$  release blocker. In this study, different methodological approaches were used, such as isometric stress (EI,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), that permitted to identify the sensitivity of the myocardium to ryanodine, with the majority contribution of  $\text{Ca}^{2+}$  from the SR. The use of time to peak tension and time to half relaxation parameters (TPT and THR, ms) were ineffective to evaluate the contraction and relaxation performances during time effect experiments. New approaches such as contraction rates and initial relaxation rates (TC and TIR,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) demonstrated directly the impairment of the myocardium exposed to ryanodine. The negative staircase effect, characteristic of the teleost's force-frequency relationship was evidenced by EI. The maximum rates of contraction and maximum rates of relaxation (TMC and TMR,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and the average rates of contraction and average rates of relaxation (TMedC and TMedR,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) showed the impairment of the myocardium contractility exposed to ryanodine as well as the low sensitivity of frequency increments on the contractility when considered the values of TPT and THR. The TMedC and TMedR values indicated a greater possibility of heart rate regulation than the TMC and TMR values, probably due to these estimates consider the amount of instantaneous rate changes of contraction wave on calculation instead of just one point on the curve. The cardiac pumping capacity (CBC,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^2\cdot\text{min}^{-1}$ ) showed that the optimal range of frequency for isometric contraction is narrow and that the myocardium of the species should be working on the limit at rest. The analyses of integral of isometric tension (ITI,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}$ ), and integral of isometric tension per minute (ITIPM,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}$ ), showed that these were unsuitable indexes for the assessment of cardiac contractility in the way they were calculated, as inconsistent interpretations were generated, probably by using information from the curve of contraction irrelevant to the isometric preparation. The contractility index (IC,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) created in this work, suggested that the myocardium contractility of the species is more sensitive to increases in frequency. On the other hand, the contractility index per minute (ICPM,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) showed that the optimum range of frequencies for the *B. amazonicus* myocardial contraction can be much wider and could allow performance reserve, such as reported in other studies of cardiac function in teleosts. The protein expression of SERCA2a and phospholamban (PLB) were analysed by Western Blot technique and their expression supported the findings of the SR functionality. The comparative analysis of these proteins, using amino acid sequences available in public databases (GenBank and UniProt), revealed levels of similarity between the SERCA2a and PLB in fish and other vertebrates, strengthened the findings of studies with Western Blot experiments. Taken together, the results suggest that *B. amazonicus* myocardium is dependent on SR  $\text{Ca}^{2+}$  stores under physiological frequencies and, despite the negative staircase pattern, must possess a performance reserve at supraphysiologic frequencies.

**Keywords:** Integrated isometric tension. Sarcoplasmic reticulum. SERCA2a. Phospholamban. *Western Blot*. Analysis of molecular similarity.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Considerações gerais	3
1.2. Fisiologia cardíaca comparativa	3
1.3. Acoplamento excitação-contração	7
1.4. O acoplamento excitação-contração em vertebrados basais	12
1.5. Mecânica da contração	15
1.6. Análise biomolecular	19
1.7. Evolução molecular	21
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
2.1. Objetivos específicos	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
3.1. Espécie estudada	24
3.2. Preparações experimentais <i>in vitro</i>	25
3.3. Protocolos experimentais	30
3.3.1. Efeito do tempo	30
3.3.2. Relação força-frequência	30
3.3.3. Participação do retículo sarcoplasmático no ciclo cardíaco	31
3.4. Tratamento dos dados	31
3.5. Análise estatística	37
3.6. <i>Western Blot</i>	38
3.6.1. Homogeneização do músculo cardíaco	38
3.6.2. Quantificação de proteína	40
3.6.3. Eletroforese	40
3.6.4. Transferência	43
3.6.5. Incubação com anticorpos	45
3.6.6. Revelação das membranas	46
3.7. Análise molecular	47
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>48</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>72</b>
5.1. Análise mecânica da contração isométrica	72
5.2. Análise biomolecular	82
5.3. Evolução molecular	85
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>87</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>89</b>
<b>8. APÊNDICES</b>	<b>99</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

- Figura 1:** Pós-carga, volume sistólico, trabalho cardíaco e frequência cardíaca em peixes. Painel superior: valores para pós-carga (diferença entre a média da pressão aórtica ventral e a pressão no seio venoso) e o volume sistólico. As colunas abertas significam pós-carga *in vitro* basal ou *in vivo* em repouso, colunas sólidas negras significam volume sistólico *in vitro* basal ou *in vivo* em repouso. Painel central: Valores correspondentes de trabalho cardíaco. Painel inferior: valores correspondentes de frequência cardíaca. No painel superior também são apresentados os aumentos de pós-carga (acima das colunas abertas) e de volume sistólico (acima das colunas sólidas) em condições de trabalho cardíaco máximo. Na maioria das espécies do lado esquerdo do gráfico (7 espécies do lado esquerdo) há uma elevação na pós-carga sem alteração do volume sistólico, enquanto nas espécies ao lado direito um aumento no volume sistólico sem alteração na pós-carga. Valores basais para o ventrículo esquerdo de rato e para rã foram incluídos para comparações. Modificado de TOTA E GATUSO (1996)..... 05
- Figura 2:** Efeito da rianodina sobre a força de contração (% dos valores controle) das tiras ventriculares de várias espécies de vertebrados (adaptado de RIVAROLI, 2002)..... 14
- Figura 3:** Registros sobrepostos de contração isométrica do músculo papilar. Números de 1 a 4 indicam o aumento da tensão de repouso e a correspondente tensão desenvolvida.  $dp/dt$  = taxa máxima de desenvolvimento de tensão isométrica (linhas pontilhadas). IIT = Integral da tensão isométrica sistólica (área sombreada). Adaptado de SIEGEL E SONNENBLICK (1963)..... 17
- Figura 4:** Representação esquemática do sítio ativo (vermelho) de proteínas que pode ser composto por diversos seguimentos da sequência primária que se aproximam quando a proteína encontra-se na forma tridimensional (A) ou consistir de um único trecho de aminoácidos da sequência primária (B). Em ambos os casos, as sequências que compõe o sítio ativo tendem a ser conservadas em diferentes espécies (modificado de BARTON *et al.*, 2007)..... 22
- Figura 5:** Ilustração de um exemplar de *B. amazonicus* e sua classificação taxonômica segundo FROESE E PAULY (1990-2008)..... 24
- Figura 6:** Anatomia do coração de peixes teleósteos. Adaptado de FARRELL E JONES (1992)..... 27
- Figura 7:** Esquema do banho de solução fisiológica. Tira ventricular fixada por pressão (1); argola circular de aço inox (2); eletrodos de estimulação (3); transdutor de força (4); borbulhamento de mistura carbogênica (5); entrada de água em temperatura controlada (6); cubeta termostatizada (7)..... 28

- Figura 8:** Plotagem dos valores de tensão de arquivos “.das” no Microsoft Excel<sup>®</sup>, já normalizados pela AST. Os gráficos exemplificam curvas em diferentes frequências de estimulação, 0,2 e 1,0 Hz. As curvas foram plotadas na mesma escala..... 29
- Figura 9:** Parâmetros da contratilidade analisados. No gráfico superior os valores mínimos indicam a tensão de repouso (RT), a tensão máxima ao longo da onda de contração determina o estresse isométrico (EI), a área entre a curva de tensão e a RT representa a integral da onda de contração (∫EIdT). No gráfico inferior temos a derivada da curva de tensão, onde são indicadas as taxas máximas de contração e relaxamento (TMC e TMR, respectivamente), São indicados também os pontos utilizados para o cálculo da TMedC, na fase da onda de contração que corresponde à contração (à esquerda da linha pontilhada) e os pontos para o cálculo da TMedR, na fase correspondente ao relaxamento (à direita da linha pontilhada)..... 36
- Figura 10:** Arranjo das amostras e suas respectivas quantidades de proteína no gel de poliacrilamida em microgramas. MPM: marcador de peso molecular; Ba: *Brycon amazonicus*; Rn: *Ratus norvegicus*; Total: Fração total de membranas; Microssomal: Fração microssomal. Os números acima indicam a quantidade de proteínas em µg carregada em cada poço..... 43
- Figura 11:** Esquema da posição do gel de poliacrilamida, após a eletroforese vertical, e da membrana de PVDF no sanduíche de transferência para a eletroforese..... 44
- Figura 12:** Efeito do tempo de exposição experimental nas condições controle e em exposição à 10 µM de Rianodina. Os valores do Estresse Isométrico (EI) estão representados no painel superior e os parâmetros dependentes do tempo, TPT e THR, respectivamente nos painéis intermediário e inferior. Valores Médios ± E.P.M.. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ )..... 49
- Figura 13:** Efeito do tempo de exposição experimental nas condições controle e em exposição à 10 µM de Rianodina. Os valores de Taxa de Contração (TC) estão representados no painel superior e as Taxas Iniciais de Relaxamento (TIR) no painel inferior. Valores Médios ± E.P.M.. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ )..... 50
- Figura 14:** Efeito da elevação da frequência de estimulação no EI dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10 µM de rianodina. Valores Médios ± E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). A subtração dos valores médios do grupo Rianodina do valores médios do grupo Controle, em cada frequência testada, gerou a curva “Contribuição RS” ..... 51

- Figura 15:** Efeito da elevação da frequência de estimulação no TPT e THR dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu\text{M}$  de Rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ )..... 52
- Figura 16:** Tensão de Repouso (RT) durante elevações da frequência de estimulação nas preparações do grupo controle e do grupo exposto à rianodina (10  $\mu\text{M}$ ). Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ )..... 53
- Figura 17:** Efeito da elevação da frequência de estimulação na CBC dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu\text{M}$  de rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). A subtração dos valores médios do grupo Rianodina do valores médios do grupo Controle, em cada frequência testada, gerou a curva “Contribuição RS” ..... 55
- Figura 18:** Efeito da elevação da frequência de estimulação na TMC (painel superior) e TMR (painel inferior) dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu\text{M}$  de Rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).... 56
- Figura 19:** Efeito da elevação da frequência de estimulação na TMedC (painel superior) e TMedR (painel inferior) dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu\text{M}$  de rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).... 57
- Figura 20:** Efeito da elevação da frequência de estimulação na ITI de uma única onda de contração, nos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu\text{M}$  de Rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ )..... 58
- Figura 21:** Efeito da elevação da frequência de estimulação na ITIPM dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu\text{M}$  de rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ )..... 59

- Figura 22:** Efeito da elevação da frequência de estimulação no IC dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu$ M de rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ )..... 60
- Figura 23:** Efeito da elevação da frequência de estimulação no ICPM dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu$ M de rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais, os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle e os símbolos de *paus* representam diferenças significativas para os valores de ICPM a 0.8 Hz ( $P < 0,05$ )..... 61
- Figura 24:** Análise da expressão da SERCA2a em ventrículos de *B. amazonicus* e ventrículo esquerdo do *R. norvegicus*. Os números acima indicam a quantidade de proteínas ( $\mu$ g) carregadas no gel para a corrida. Abaixo os símbolos indicam: PM, marcador de peso molecular;  $F_T$ , Fração total de membranas e  $F_M$ , Fração microssomal. A seta indica a SERCA2a, com massa molecular estimada de 110 kDa, baseado na mobilidade relativa da proteína.. 64
- Figura 25:** Análise da expressão do fosfolambano em ventrículos de *B. amazonicus* e em ventrículo esquerdo do *R. norvegicus*. A. exposição do filme radiográfico por 5 minutos. B. Exposição do filme radiográfico por 12 minutos. Os números acima da figura indicam a quantidade de proteínas ( $\mu$ g) carregadas no gel para a corrida. Abaixo o símbolo PM indica marcador de peso molecular... 64
- Figura 26:** Alinhamentos múltiplos das sequencias da SERCA2a obtidos com o programa clustalW, implementado nos software MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007). O programa computacional Bioedit (HALL, 1999) foi utilizado para editar as sequencias para que todas tivessem o mesmo tamanho nas análises subsequentes..... 65
- Figura 27:** Reconstruções filogenéticas obtidas a partir das sequências de aminoácidos da SERCA2a utilizando os métodos de *Neighbor-Joining* (A) e Máxima Verossimilhança (B)..... 67
- Figura 28:** Alinhamento da sequencia de aminoácidos do PLB (A); os pontos representam aminoácidos idênticos ao da primeira sequencia (*Homo*) no sítio equivalente das outras espécies estudadas. Reconstruções filogenéticas obtidas a partir das sequencias de aminoácidos da PLB utilizando os métodos de *Neighbor-Joining* (B) e Máxima Verossimilhança (C). Número de acesso das sequências utilizadas: *Canis familiaris* (P61012), *Sus scrofa* (P61013), *Bos taurus* (A4IFH6), *Oryctolagus cuniculus* (P61015), *Homo sapiens* (P26678), *Mus musculus* (P61014), *Rattus norvegicus* (P61016), *Gallus gallus* (P26677), *Xenopus (Silurana) tropicalis* (XM\_002932106.1), *Danio rerio* (XR\_045125.2), *Tetraodon nigroviridis* (CAG06667.1)..... 70

<b>Figura 29:</b>	Diagrama esquemático dos domínios identificados na análise das sequências do PLB de sete espécies representativas do grupo. A localização dos sítios ativos esta evidenciada pelas barras pretas representadas nas figuras.....	71
<b>TABELAS</b>		
<b>Tabela 1:</b>	Composição do Gel Resolving de poliacrilamida, com densidades diferentes (7,5 e 10%) para a eletroforese de cada proteína estudada (SERCA2a e Fosfolambano, respectivamente). As quantidades na tabela são referentes à confecção de 2 géis de 1,5mm de espessura no sistema Mini-Protean da Bio-Rad. Buffer 1: Tris 18,17 g; SDS 10% 4 mL; H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. 100 mL e pH final 8,8.....	41
<b>Tabela 2:</b>	Tensão de repouso (RT) durante elevações da frequência de estimulação nas preparações do grupo controle e do grupo exposto à rianodina (10 µM). Valores Médios ± E.P.M.....	54
<b>Tabela 3:</b>	Quantidade de proteínas totais nos homogenatos obtidos para estudo da expressão protéica da SERCA2a, referentes às frações de membranas total e microsomal do tecido ventricular do teleósteo <i>B. amazonicus</i> e do roedor <i>R. norvegicus</i> .....	61
<b>Tabela 4:</b>	Volume das amostras para a quantidade de proteína total desejada no processo de eletroforese, segundo a concentração de proteínas nos homogenatos do tecido ventricular de <i>B. amazonicus</i> e <i>R. norvegicus</i> , nas frações de membrana total e microsomal obtidos no presente estudo. Valores para homogenatos obtidos para estudo da expressão da SERCA2a.....	62
<b>Tabela 5:</b>	Quantidade de proteínas totais nos homogenatos obtidos para estudo da expressão do fosfolambano, referentes a fração microsomal do tecido ventricular do teleósteo <i>B. amazonicus</i> e do roedor <i>R. norvegicus</i> .....	63
<b>Tabela 6:</b>	Volume das amostras para a quantidade de proteína total desejada no processo de eletroforese, segundo a concentração de proteínas nos homogenatos do tecido ventricular de <i>B. amazonicus</i> e <i>R. norvegicus</i> , nas fração microsomal obtidos no presente estudo. Valores para homogenatos obtidos para estudo da expressão da fosfolambano.....	63
<b>Tabela 7:</b>	Nomes específicos, números de acesso das sequências nos bancos de dados e os tipos e número (n) de possíveis sítios ativos identificados nas análises da SERCA 2a. Diagramas esquemáticos dos sítios identificados podem ser visualizados nos Apêndices.....	68

## APÊNDICES

<b>Apêndice 1a:</b>	Diagrama esquemático dos sítios ativos identificados na análise das sequencias de SERCA2a em <i>M. musculus</i> . Os pontos pretos indicam a localização dos sítios ativos envolvidos com as diferentes funções desempenhadas pela SERCA2a.....	99
<b>Apêndice 1b:</b>	Diagrama esquemático dos sítios ativos identificados na análise das sequencias de SERCA2a em <i>O. cuniculus</i> . Os pontos pretos indicam a localização dos sítios ativos envolvidos com as diferentes funções desempenhadas pela SERCA2a.....	100
<b>Apêndice 1c:</b>	Diagrama esquemático dos sítios ativos identificados na análise das sequencias de SERCA2a em <i>G. gallus</i> . Os pontos pretos indicam a localização dos sítios ativos envolvidos com as diferentes funções desempenhadas pela SERCA2a.....	101
<b>Apêndice 1d:</b>	Diagrama esquemático dos sítios ativos identificados na análise das sequencias de SERCA2a em <i>D. rerio</i> . Os pontos pretos indicam a localização dos sítios ativos envolvidos com as diferentes funções desempenhadas pela SERCA2a.....	102
<b>Apêndice 2:</b>	Gráfico representando os níveis de hidrofobicidade e hidrofiliidade da proteína SERCA 2a em mamíferos ( <i>M. musculus</i> , <i>O. caniculus</i> ), aves ( <i>G. gallus</i> ) e teleósteo ( <i>D. rerio</i> ). Os dados foram obtidos utilizando o programa ProtScale ( <a href="http://expasy.org/tools/protscale.html">http://expasy.org/tools/protscale.html</a> ) (GASTEIGER <i>et al.</i> , 2005).....	103
<b>Apêndice 3:</b>	Composição química observada nas sequencias de aminoácidos da SERCA2a em mamíferos ( <i>M. musculus</i> , <i>O. caniculus</i> ), aves ( <i>G. gallus</i> ) e teleósteo ( <i>D. rerio</i> ). Os dados foram gerados utilizando o programa ProtParam ( <a href="http://expasy.org/tools/protparam.html">http://expasy.org/tools/protparam.html</a> ) (GASTEIGER <i>et al.</i> , 2005).....	104

## 1. INTRODUÇÃO

A constante dependência do trabalho cardíaco para a manutenção da vida fez o estudo do coração tornar-se prioridade para muitos pesquisadores, o que resultou na elucidação de detalhes da arquitetura morfofuncional cardíaca de mamíferos, já que é este o modelo mais relacionado ao coração humano e às doenças relacionadas ao mesmo, tornando tais pesquisas viáveis pelo financiamento conseguido com o apelo que envolve a saúde humana. O avanço no conhecimento da fisiologia cardíaca de mamíferos, decorrente de pesquisas com modelos experimentais tais como ratos, furões, coelhos, cobaias e cães, permitiu grandes avanços na medicina e na indústria farmacêutica.

É de fundamental importância a percepção de que apesar do modelo experimental cardíaco de mamíferos apresentar grande plasticidade quanto ao equilíbrio entre os mecanismos intracelulares de manejo do íon cálcio (principalmente trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e retículo sarcoplasmático), este ainda é um modelo muito limitado quanto a plasticidade que o músculo cardíaco de vertebrados pode exibir na sua ultraestrutura e fisiologia celular. O fato da história evolutiva dos vertebrados basais (peixes, anfíbios e répteis) ser no mínimo 100 milhões de anos mais antiga que a história evolutiva dos mamíferos deve implicar em uma diversidade morfofisiológica muito maior nos vertebrados basais, já que estes foram expostos durante muito mais tempo às pressões ambientais dos diferentes ecossistemas que ocupam. A esperada riqueza de adaptações em todos os níveis de organização biológica dos vertebrados basais (de moléculas a órgãos altamente especializados) deve ser encarada como potencial de biodiversidade a ser explorado, principalmente para os fisiologistas comparativos, para os quais a adaptação consiste na principal ferramenta de trabalho.

Para esta tese foram desenvolvidas e testadas abordagens que não têm sido convencionalmente utilizadas na fisiologia cardíaca comparada no Brasil. As inovações propostas incluem: 1) análise da contratilidade baseadas em índices matemáticos mais sólidos do que os utilizados convencionalmente; e 2) análise da expressão de proteínas do ciclo cardíaco a partir do ponto de vista da biologia molecular.

No presente estudo, uma análise mais refinada dos parâmetros utilizados para a mensuração da contratilidade cardíaca foi realizada. Além de metodologias convencionais como os valores absolutos da tensão isométrica e as taxas de desenvolvimento de tensão normalmente utilizadas na fisiologia cardíaca comparada, uma revisão e revisitação de metodologias clássicas como as aproximações matemáticas para determinar o esforço muscular propostas em 1963 por John H. Siegel e Edmund H. Sonnenblick foram realizadas com intuito de resgatar uma informação mecânica que deixou de ser explorada por, possivelmente, dificuldades na integração entre problemas físicos e biológicos que “após anos de pesquisa podem tornar-se uma bola de neve sem solução” (BASSANI, 2010).

Além da investigação da contratilidade por meio da exploração da mecânica clássica, esta tese teve o objetivo de lançar um olhar diferente para os resultados encontrados na fisiologia cardíaca comparada. É comum realizar aproximações farmacológicas por meio de bloqueadores e estimuladores, que normalmente revelam o funcionamento de mecanismos específicos. Com o avanço da farmacologia e da química, drogas de última geração garantem com precisão a ação específica de tais fármacos, no entanto, quando se trata de fisiologia comparada, quando são contrastados modelos filogeneticamente muito distantes, a diferença na composição de proteínas podem não permitir a especificidade desejada.

Essa problemática torna-se lugar comum no caso de pesquisas com fisiologia comparada, onde milhões de anos de evolução podem separar as linhagens comuns dos organismos que apresentam os mecanismos estudados em questão, o que traz à fisiologia comparada a necessidade de elaboração de trabalhos minuciosamente criteriosos, já que muitas vezes trata-se da definição de novos modelos experimentais. Sob este ponto de vista, outro objetivo deste trabalho foi utilizar metodologias que endossassem as aproximações farmacológicas e o olhar escolhido para essa atestação foi o da biologia molecular e da bioinformática.

## 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O atual conhecimento acerca da fisiologia cardíaca de espécies de vertebrados basais é extremamente escasso se considerarmos uma análise amostral frente ao número total de espécies. Das aproximadamente 40 mil espécies de vertebrados existentes, a grande maioria são de vertebrados basais (cerca de 36.200 espécies). Esse elevado percentual dentre os vertebrados é plenamente justificável se tivermos em mente a sua longa história evolutiva.

As primeiras espécies de peixes surgiram nos primórdios do período Ordoviciano e a segunda classe mais antiga de vertebrados, os anfíbios, surgiram somente 200 milhões de anos mais tarde, no final do período Devoniano e apresentam atualmente cerca de 4600 espécies viventes. Os répteis surgiram 50 milhões de anos após os anfíbios e hoje contam com aproximadamente 7000 espécies viventes conhecidas. Assim, nestes mais de 450 milhões de anos de história evolutiva, os vertebrados basais ocuparam todos os corpos d'água do planeta, ambientes de transição aquático-aeroterrestre, inclusive ambientes desérticos, e desenvolveram adaptações que os fazem evolutivamente bem sucedidos em todos os ambientes por eles ocupados (HICKMAN *et al.*, 2001).

É imprescindível entender a fisiologia de uma maior quantidade de vertebrados, pois, só desta maneira poderemos explorar economicamente, e de uma maneira sustentável, a riqueza genética existente nestas comunidades e defender a conservação das áreas em que habitam os organismos estudados de uma forma mais eficaz.

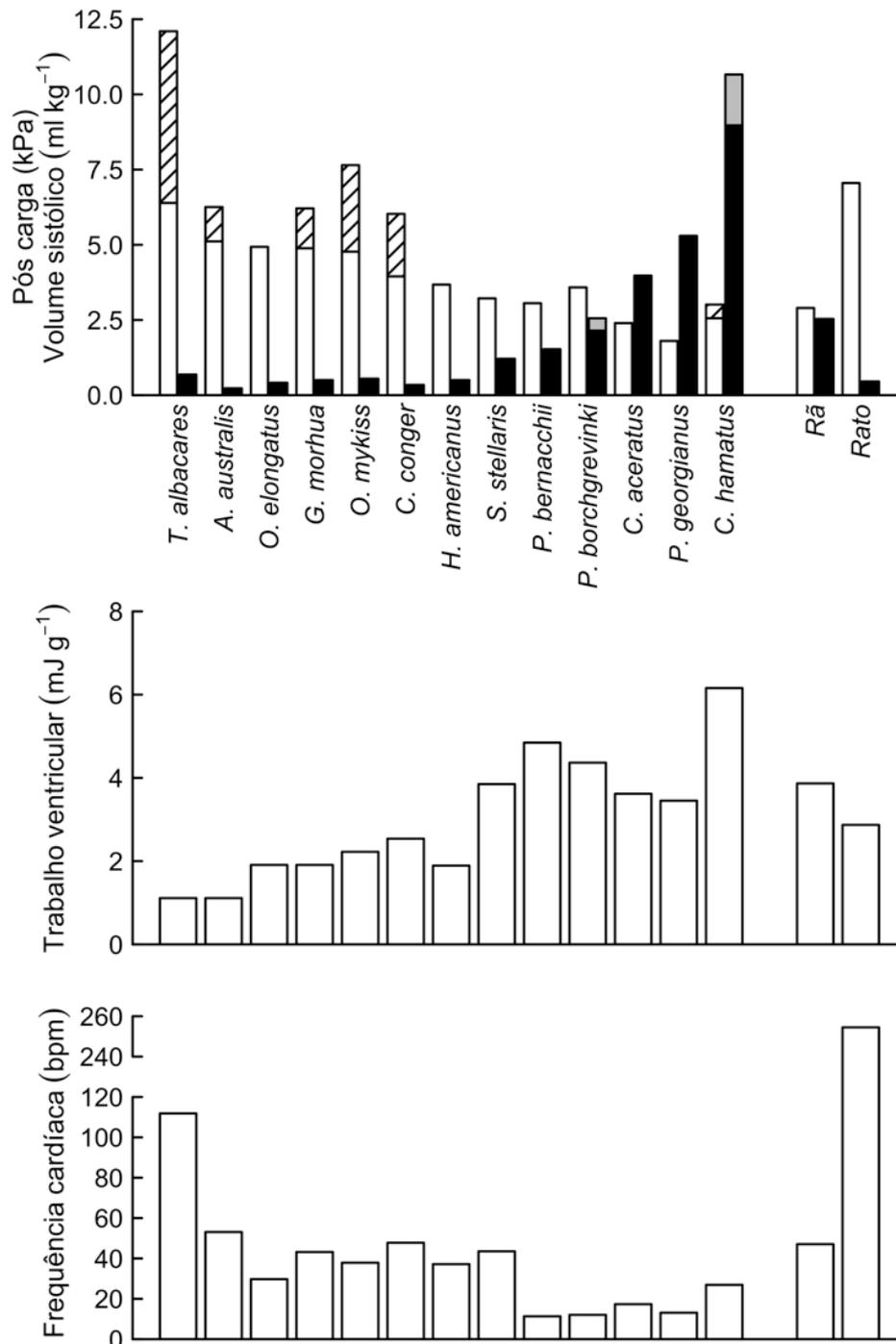
## 1.2. FISILOGIA CARDÍACA COMPARATIVA

Os vertebrados são dependentes do funcionamento contínuo da bomba cardíaca e qualquer alteração nesta função ameaça diretamente sua sobrevivência, já que o trabalho cardíaco propulsiona o sangue que supre os tecidos com os nutrientes e o oxigênio necessários para seu funcionamento, está envolvido na retirada de catabólitos e ainda é utilizado como veículo para moduladores humorais e nervosos. Desta forma, é de se esperar que a evolução dos vertebrados deva ter envolvido mudanças adaptativas no músculo cardíaco (GESSER; POUPA, 1983).

Já está bem estabelecido na fisiologia comparativa que o coração dos animais ectotérmicos enfrenta mudanças muito maiores do que os de animais endotérmicos, no que diz respeito ao conteúdo extracelular de gases, ao equilíbrio ácido-base e de temperatura (DRIEDZIC; GESSER, 1994). Tal variação ocorre devido às flutuações impostas pelo ambiente, hábito e a organização do sistema cardiovascular destes animais. O débito cardíaco, resultado da frequência e da força de contração, regula o fluxo sanguíneo ejetado. Desta forma, frequência e força de contração devem ser regulados a fim de que haja um fluxo apropriado para a execução do trabalho de todos os tecidos nas mais variadas condições impostas pelo ambiente (TIBBITS *et al.*, 1992), ainda mais se tratando de animais ectotérmicos, onde a homeostase deve ser alcançada durante flutuações metabólicas resultantes de variações ambientais.

A diferença de pressão associada ao fluxo é o que está envolvido no funcionamento de qualquer bomba e pode ser representado pelo trabalho cardíaco, determinado pelo produto do volume ventricular sistólico e pressão aórtica média (pós-carga) contra a qual o sangue é ejetado pelo ventrículo (TOTA; GATUSO, 1996). Mais uma vez temos nos vertebrados basais um exemplo claro da plasticidade que o coração desses animais pode exibir. Teleósteos podem apresentar bombas cardíacas que movem um volume relativamente pequeno contra alta pressão arterial (pós-carga) ou que movem um grande volume contra pequena pressão arterial. Pode-se notar pela Figura 1 que o atum é um exemplo de teleósteo cujo coração trabalha com alta pressão e propulsiona a cada ciclo um pequeno volume de sangue, característica esta associada à mioarquitetura do coração destes animais, com grande quantidade de camada compacta (TOTA; GATUSO, 1996), ao hábito de vida migratório com natação rápida de alta performance e à capacidade para endotermia regional e à capacidade aeróbica elevada (GRAHAM; DICKSON, 2004). No outro extremo dos teleósteos exemplificados temos o *Icefish* (*Chionodraco hamatus*), que apresenta um elevado volume sistólico propulsionado contra uma baixa pressão arterial (TOTA; GATUSO, 1996).

**Figura 1.** Pós-carga, volume sistólico, trabalho cardíaco e frequência cardíaca em peixes. Painel superior: valores para pós-carga (diferença entre a média da pressão aórtica ventral e a pressão no seio venoso) e o volume sistólico. As colunas abertas significam pós-carga *in vitro* basal ou *in vivo* em repouso, colunas sólidas negras significam volume sistólico *in vitro* basal ou *in vivo* em repouso. Painel central: Valores correspondentes de trabalho cardíaco. Painel inferior: valores correspondentes de frequência cardíaca. No painel superior também são apresentados os aumentos de pós-carga (acima das colunas abertas) e de volume sistólico (acima das colunas sólidas) em condições de trabalho cardíaco máximo. Na maioria das espécies do lado esquerdo do gráfico (7 espécies do lado esquerdo) há uma elevação na pós-carga sem alteração do volume sistólico, enquanto nas espécies ao lado direito um aumento no volume sistólico sem alteração na pós-carga. Valores basais para o ventrículo esquerdo de rato e para rã foram incluídos para comparações.



Fonte: Adaptado de TOTA; GATUSO, 1996.

A implicação dessas características incide diretamente sobre a maneira adotada por cada espécie para modular o débito cardíaco. Ao tomar-se como exemplo o rato, nota-se que o mesmo apresenta características de pós-carga e volume sistólico semelhante ao atum e que ambos apresentam alta frequência de contração. A frequência cardíaca elevada implica em um menor tempo de enchimento ventricular que, conseqüentemente, pode gerar uma redução do volume sistólico (CURI; PROCÓPIO, 2009). Muitos teleósteos apresentam redução da força de contração em função da elevação da frequência, a redução da contratilidade nessas condições limita a o aumento do volume de ejeção, e este pode ser o motivo de muitos peixes variarem o volume de ejeção para atender a demanda cardíaca (FARRELL; JONES, 1992).

No outro extremo está o “*icefish*”, que possui um comportamento hemodinâmico comparável ao da rã e muitos outros teleósteos (Figura 1), com volume sistólico elevado e pós-carga relativamente reduzida. Nesse caso, a baixa frequência apresentada deve ser um reflexo da baixa capacidade contrátil (observada pela pequena pós-carga), os dados da literatura sugerem que nesses organismos os limites para a modulação da força contrátil ou frequência de contração para a regulação do débito cardíaco devam ser estreitos (TOTA; GATUSO, 1996).

A contração fisiológica gera tanto a força isométrica (pressão ventricular) quanto o rápido encurtamento (ejeção do sangue), havendo duas maneiras de mudar o componente “força da contração cardíaca”: pela alteração da amplitude e/ou duração do transiente de  $Ca^{2+}$  citosólico e pela alteração da sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$  (BERS, 2002). A sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  pode ser regulada pela alteração do comprimento da fibra pelo mecanismo de Frank-Starling, onde a interação actina-miosina aumenta com o estiramento. O transiente de  $Ca^{2+}$  está por sua vez relacionado à sua cinética e às rotas que podem ser tomadas pelo íon no ciclo de contração e relaxamento (BERS, 2002).

Há diversas técnicas para o estudo da capacidade contrátil de músculos, como a preparação isométrica e a preparação *work loop*. Na técnica *work loop*, o músculo é submetido a mudanças sinusoidais do comprimento, o que permite a mensuração do trabalho e da potência (LAYLAND; KENTISH, 2000). Na preparação

isométrica é possível isolar da contração as mudanças no comprimento da fibra e estudar exclusivamente o componente da força relacionado à contratilidade (transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Neste caso, a contratilidade descreve a força de contração num determinado comprimento da fibra (SHIELS *et al.*, 2002).

Levando-se em consideração a capacidade contrátil, esta é reduzida com a elevação da frequência na maioria dos teleósteos, o que é denominado de efeito escada negativo (SHIELS *et al.*, 2002). As baixas frequências de trabalho apresentadas pelo miocárdio de teleósteos deve estar relacionada à sua habilidade contrátil e às necessidades hemodinâmicas do seu sistema circulatório.

### 1.3. ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO

As células cardíacas apresentam junções comunicantes (junções GAP), estruturas descritas por Unwin e Zampighi em 1980, formados pela ligação entre dois semi-canais, os conexons, que conectam as membranas de duas células vizinhas (SALAMEH; DHEIN, 2011). Cada conexon é formado por seis subunidades as conexinas, cada conexina apresenta quatro domínios transmembrana (M1-M4) dois loops extracelulares e, intracelularmente apresenta um loop e os terminais amina (N) e ácido carboxílico (C), a junção dos conexons determina a estrutura dodecamérica da junção GAP. O poro central de 12 Å de diâmetro permite a livre passagem de íons, caracterizando sua ação não seletiva (SALAMEH; DHEIN, 2011). Tal propriedade permite que a despolarização iniciada nas células marcapasso seja difundida por toda a massa cardíaca, com o consequente recrutamento de todas as fibras, de forma que o coração atue funcionalmente como um sincício multinucleado (YUE, 1987). Como todos os miócitos são recrutados a cada ciclo cardíaco, a modulação da intensidade da força de contração incide no recrutamento de mais ou menos miofibrilas contráteis pela disponibilidade do íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), assim, a geração de força, e em parte a velocidade da frequência cardíaca, dependem da quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  que interage com as proteínas contráteis, bem como, do tempo em que o  $\text{Ca}^{2+}$  permanece disponível no citosol para esta interação (YUE, 1987).

O conjunto de processos que ocorrem desde a despolarização da membrana do miócito até a interação das proteínas contráteis é denominado de acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C) (VORNANEN *et al.*, 2002). O entendimento dos mecanismos envolvidos no acoplamento E-C nos fornecem subsídios para explicar a estratégia utilizada, por uma determinada espécie, para manter um débito cardíaco apropriado às suas necessidades.

O potencial de ação (PA) da célula muscular é iniciado com a abertura dos canais de  $\text{Na}^+$ , decorrente da alteração elétrica local, devido à passagem de íons positivos ( $\text{Na}^+$ ) pelas junções comunicantes com um miócito adjacente, cujo PA já tenha sido inicializado. A positivação local muda o potencial elétrico de íons próximo à junção comunicante, o que resulta na abertura de canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem na sarcolema. Esses canais possuem um domínio intracelular com aminoácidos positivos, o que pode promover mudanças na sua conformação com a alteração do potencial elétrico (BERS, 2000).

Os canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem apresentam três estados possíveis: fechado ativado, aberto ou fechado inativado, com o segmento transmembrana S4 funcionando como um sensor do potencial de membrana (MANNUZZU *et al.*, 1996, YANG *et al.*, 1996), são os responsáveis pela período de rápida despolarização do potencial de ação. Existem dois tipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem no coração, os canais do tipo T e do tipo L. Os canais do tipo L exercem um papel central na contração cardíaca, sendo responsáveis pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e pelas características elétricas deste tecido, como o platô característico do potencial de ação cardíaco. Os canais do tipo L são polipeptídios heterotetraméricos complexos, compostos de subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2/\delta$ ,  $\beta$  e, em alguns tecidos,  $\gamma$ , atualmente são conhecidos 10 genes para a subunidade  $\alpha 1$ , tais isoformas são utilizadas para o agrupamento desses canais em diferentes classes (CHATTIPAKORN *et al.*, 2011). Há uma série de evidências da expressão dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo T durante o desenvolvimento embrionário, no entanto, ocorrem em apenas alguns tecidos especializados na vida adulta, como os nodos sinoatrial e atrioventricular do marca-passo cardíaco ou em células secretoras (LORY *et al.*, 2006). O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nos miócitos na fase final do PA é decorrente dos canais L, enquanto que canais T contribuem para a fase inicial do PA em fibras atriais e do sistema de Purkinje. Ambos canais, T e L, abrem e fecham rapidamente,

mas não tão rapidamente quanto os canais de  $\text{Na}^+$ , a consequência disso é a manutenção de um potencial de membrana positivo prolongado, o que é bastante característico no PA ventricular cardíaco (BERS, 2000).

Outro importante componente do acoplamento E-C cardíaco é o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), um sistema de contra-transporte reversível com estequiometria de 3  $\text{Na}^+$  para 1  $\text{Ca}^{2+}$ , com consequente corrente de 1 carga positiva na direção do transporte de  $\text{Na}^+$ , portanto ao se referir à corrente do trocador NCX ( $I_{\text{Na/Ca}}$ ) esta é referida no mesmo sentido da corrente de  $\text{Na}^+$ , o sentido do fluxo de carga. A direção e amplitude do transporte do NCX dependem do potencial de membrana bem como das concentrações intra e extracelulares de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (BERS, 2000). Simplificadamente, altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico favorecem seu efluxo (modo normal - influxo da  $I_{\text{Na/Ca}}$ ), enquanto potenciais de membrana positivos e altas concentrações de  $\text{Na}^+$  intracelular favorecem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (modo reverso - efluxo da  $I_{\text{Na/Ca}}$ ) (BERS, 2002).

O  $\text{Ca}^{2+}$  que promove a interação actino-miosínica ( $\text{Ca}^{2+}$  ativador) pode ser proveniente de diferentes fontes: o meio extracelular ou as reservas internas. O  $\text{Ca}^{2+}$  ativador de origem extracelular pode invadir o citosol através dos canais tipo L e do trocador NCX no modo reverso. O  $\text{Ca}^{2+}$  de origem intracelular pode ser proveniente do retículo sarcoplasmático (RS) e da mitocôndria. O  $\text{Ca}^{2+}$  ciclado pela mitocôndria pode entrar na organela por um transportador *uniporter* de  $\text{Ca}^{2+}$ , o que representa apenas 1% do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  sob condições fisiológicas. Em condições fisiológicas essa pequena quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  precisa ser retirada da mitocôndria, o que ocorre por um trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mais lento que o NCX sarcolemal (BERS, 2008). Apesar da ciclagem do  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria ter pouca importância para o  $\text{Ca}^{2+}$  ativador, ele pode ativar a  $\text{F}_1\text{F}_0\text{ATPase}$  e desidrogenases mitocondriais (piruvato desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, isocitrato desidrogenase dependente de NAD), tornando-se um importante mecanismo de retroalimentação para o suprimento energético de acordo com a demanda (BERS, 2008).

O RS é um compartimento membranosamente completamente intracelular, que não é contínuo à sarcolema, sua principal função nos músculos é sequestrar e liberar o  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol. O volume do RS varia nos diferentes tipos celulares e entre espécies (BERS, 2000; DI MAIO; BLOCK, 2008). Exceto pelas regiões de junção entre o RS e

a sarcolema, a membrana do RS é bastante homogênea contendo principalmente a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do RS (SERCA –*Sarcoplasmic-Endoplasmic Reticulum ATPase*) (BERS, 2000). Na região de junção entre o RS e a sarcolema localizam-se os canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, que por exibirem alta afinidade pela rianodina, um alcalóide neutro da planta *Ryania speciosa*, foram denominados receptores de rianodina (RyR) (BERS, 2000).

Cada junção entre a sarcolema (superfície do túbulo T) e o RS apresentam 10 a 25 canais tipo L e 100 a 200 RyR agrupados em um *couplon*. Quando ocorre a abertura dos canais tipo L, a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se eleva na fenda da junção para 10 a 20  $\mu\text{M}$ , o que ativa os RyR a liberarem o  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. A abertura de um único canal pode disparar a liberação do RS, mas durante o PA muitos canais se abrem, criando uma margem segura para o acoplamento, elevando a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  local para 200 a 400  $\mu\text{M}$  que se difunde para o citosol e ativa as proteínas contráteis (BERS, 2008).

Tanto proteína quinase A (PKA) quanto proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina II (CAMKII) regulam o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e a liberação pelos RyRs (BERS, 2008). Essas quinases fosforilam diferentes sítios nessas proteínas, com ativação predominante da  $I_{\text{Ca}}$  pela PKA e dos RyRs pela CAMKII, ambas são acionadas pela estimulação adrenérgica (BERS, 2008).

A origem do  $\text{Ca}^{2+}$  implica em importantes diferenças na produção de força, já que pode influenciar a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  livre que é liberado no citosol a cada ciclo cardíaco, bem como pode influenciar no tempo que o  $\text{Ca}^{2+}$  permanece livre no citosol promovendo a interação actino-miosínica.

FABIATO (1983) propôs que, em mamíferos, o influxo transarcolemal de cálcio, através do NCX e de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L dispare a liberação de uma quantidade ainda maior deste íon do RS, através dos RyRs (BERS, 1991; VANGHELUWE, *et al.*, 2006), mecanismo denominado liberação de cálcio induzida pelo cálcio. Apesar do fato da magnitude do influxo de cálcio através dos canais lentos da sarcolema ser variável entre as espécies de mamíferos, a maioria dos estudos indica que este é insuficiente em magnitude para suportar a contração (BERS, 1991; CHAPMAN, 1983). Assim, o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado do RS constitui-se na fonte principal deste íon para a contração no coração dos mamíferos (WIER, 1990).

A SERCA2a é a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do RS cardíaco, com peso molecular de 110 kDa e, juntamente com o NCX, constituem os principais mecanismos de remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (BERS, 2008). Num estado de equilíbrio, ou seja, quando é alcançado o relaxamento após uma dada contração, a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  tomada pelo RS deve ser igual à quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  liberada por ele e a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  que entra pela  $I_{\text{Ca}}$  e NCX deve ser igual ao efluxo celular (BERS, 2008).

A SERCA2a é continuamente inibida pelo fosfolambano (PLB), uma pequena proteína com 16 kDa. Assim como os canais L e os RyRs, a atividade da SERCA2a é modulada pela estimulação adrenérgica via PKA e CaMKII. A PKA estimula predominantemente a atividade enzimática da SERCA2a, aumentando a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS, enquanto a CaMKII age predominantemente sobre o PLB, impedindo sua atividade inibitória sobre a SERCA2a (BERS, 2008).

A interação actino-miosínica que resulta no encurtamento celular é a base para a teoria dos filamentos deslizantes, onde, a elevação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ativa a contração pela ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  com a troponina C, parte do complexo regulatório da actina. Esse complexo regulatório é composto pela troponina I, que recobre o sítio de ligação da miosina na actina e a troponina T, que ancora todo o complexo na proteína filamentosa tropomiosina, que por sua vez, se ancora nas fendas entre as actinas F que compõe o filamento *fino*. A ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à troponina C promove interação mais forte da troponina C com a troponina I, que move-se mais profundamente na fenda das actinas F, ficando mais próximas à troponina T. Essa mudança de conformação estrutural libera na actina o sítio de ligação com a miosina, promovendo a formação das “pontes cruzadas” (VANGHELUWE, et al., 2006; BERS, 2008). Com a ligação entre actina e miosina ocorre a liberação da energia da quebra do ATP, pela atividade ATPásica da cabeça da miosina, resultando na mudança conformacional da cabeça da miosina que se dobra, puxando a actina na sua direção, resultando na contração e encurtamento dos sarcômeros (GUYTON; HALL, 2006; OFFER; RANATUNGA, 2010).

Há aproximadamente uma década foram identificados problemas termodinâmicos no modelo dos filamentos deslizantes com pontes cruzadas e outro modelo para a interação das proteínas contráteis tem sido proposto, desde então (MITSUI; OHSHIMA, 2008). O modelo proposto por Toshio Mitsui em 1999 é

caracterizado por dois diferentes estados de ligação entre a actina e a miosina, resultando em um acoplamento da hidrólise de um ATP para cada ciclo de interação. Este modelo é apoiado por muitos dados experimentais, que demonstram a distância entre os feixes e actina e miosina e a quantidade de energia utilizada no processo contrátil, dados não compatíveis com o modelo dos filamentos deslizantes e pontes cruzadas de A. F. Huxley de 1957 (HUXLEY, 2000; MITSUI; OHSHIMA, 2008). O novo modelo recebe o nome de “*polaron*”, nome dado ao movimento de um elétron em uma cadeia cristalina, onde o elétron tem diferentes níveis de associação com os átomos durante seu trajeto (MITSUI; OHSHIMA, 2008).

Há duas classes de canais de  $K^+$  relevantes para o acoplamento E-C: a) canais de  $K^+$  dependentes de voltagem, que são importantes por repolarizarem a membrana com fluxo na direção extracelular, retornando os valores do potencial de membrana ao repouso; b) canais de  $K^+$  retificadores, geradores de correntes do íon na direção intracelular, que são geralmente dependentes de ligantes e contribuem para impedir o efluxo excessivo de  $K^+$  durante a repolarização (BERS, 2000). Como os canais de  $K^+$  retificadores reduzem a velocidade de repolarização, também são importantes para a formação do platô característico do PA cardíaco.

#### 1.4. O ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO EM VERTEBRADOS BASAIS

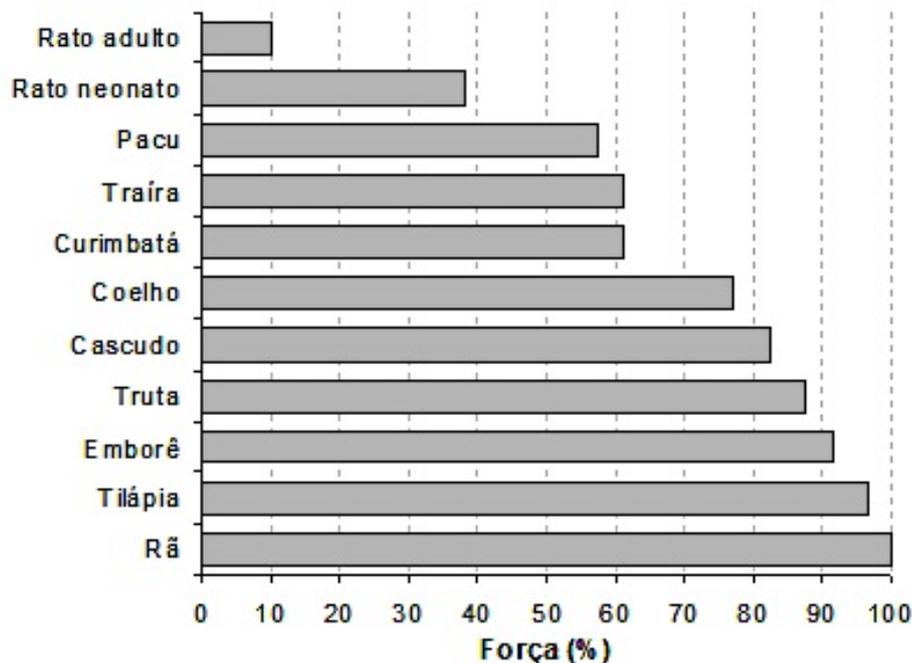
O sistema cardiovascular dos vertebrados basais tem demonstrado uma imensa plasticidade funcional, que nada mais é do que o reflexo da grande variedade estrutural que se apresenta no miocárdio dos animais desse grupo. Histologicamente, há uma grande variação entre constituição e distribuição das camadas compacta e esponjosa do miocárdio e, conseqüente, desenvolvimento da circulação coronariana e do endotélio endocárdico (TOTA *et al.*, 1983; DRIEDZIC, 1992; TOTA; GATTUSO, 1996). Quanto à organização ultra-estrutural, é fundamental salientar as diferenças nas compartimentalizações intracelulares para o manejo do cálcio durante o acoplamento excitação contração, como ocorrência de variáveis níveis de desenvolvimento do retículo sarcoplasmático (RS), ausência de túbulos T e miócitos de tamanho reduzido (TIBBITS *et al.*, 1992; VORNANEN *et al.*, 2002).

A plasticidade ultra-estrutural nos miócitos cardíacos de teleósteos implica em variadas formas de manejo do íon cálcio, fundamental para determinar a fonte do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador. A base de tal diferença entre os modelos apresentados pelo miocárdio ventricular dos teleósteos reside na relação entre a utilização do cálcio extracelular e as possíveis reservas internas (mais proeminentemente o RS). Tais diferenças podem ser observadas, por exemplo, por meio do efeito da rianodina, um alcalóide bloqueador dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. A Figura 2 mostra o efeito da rianodina no desenvolvimento de tensão em preparações multicelulares de várias espécies de vertebrados, inclusive mamíferos.

A fisiologia cardíaca de peixes vem, ao longo de sua história, elucidando a função cardíaca com o uso de técnicas de microscopia, bioquímicas e de biologia molecular, além das medidas funcionais de desempenho muscular. TIBBITS *et al.* (1992) e VORNANEN (1997) descreveram características da ultra-estrutura dos miócitos cardíacos de espécies que não apresentam funcionalidade do retículo sarcoplasmático (*Carassius carassius*) ou que apresentam tal funcionalidade em condições que normalmente não são encontradas na natureza (*Onchornyctus mykiss*), ciclando o cálcio fundamentalmente através da sarcolema a cada ciclo cardíaco, não dependendo dessa forma das reservas intracelulares. Estudos sobre os atuns e outras espécies da família *Scombridae* já demonstram não só um grande desenvolvimento do RS como o alto nível de atividade da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do RS (SERCA2a) relacionada com a importância da ciclagem intracelular desse íon (SHIELS; FARRELL, 2000; SHIELS *et al.*, 1999; LANDEIRA-FERNANDEZ *et al.*, 2004).

A variabilidade na utilização de diferentes fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  para o ciclo cardíaco é elevada também entre os teleósteos tropicais, sendo que ocorrem espécies ativas e completamente dependentes do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, como o emborê, *Bathygobius soporator* e a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, e espécies que apresentam diferentes níveis de atividade e que possivelmente utilizam os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS de maneira rotineira, como o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, o curimatá, *Prochilodus lineatus*, a traíra, *Hoplias malabaricus* e o matrinxã, *Brycon amazonicus*, entre outros (RANTIN *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2000; ANELLI *et al.*, 2004; RIVAROLI *et al.*, 2006; OLLE, 2007).

**Figura 2.** Efeito da rianodina sobre a força de contração (% dos valores controle) das tiras ventriculares de várias espécies de vertebrados.



**Fonte:** Adaptado de RIVAROLI, 2002.

A tilápia do Nilo é um teleóstero tropical que apresenta grande resistência a variações de temperatura e exibe um alto nível de atividade física com seu comportamento territorialista. Em experimentos de contração pós pausa, COSTA *et al.* (2000) estimaram que praticamente 98% do  $Ca^{2+}$  ativador deva ser de origem extracelular (Figura 2). O teleóstero neotropical matrinxã, *Brycon amazonicus*, é uma espécie migratória e reofílica, o que o faz um autêntico exemplar de peixe atlético. O matrinxã, por sua vez, apresenta dependência do  $Ca^{2+}$  ativador proveniente do RS, sendo que o miocárdio ventricular da espécie exibiu sensibilidade à rianodina, com respostas inotrópicas negativas em faixas de frequência de contração correspondentes ao que é apresentado pela espécie *in vivo* (condições fisiológicas) quando teve seus estoques de RS bloqueados pela rianodina, o que denota a utilização rotineira do  $Ca^{2+}$  do RS (OLLE, 2007).

A relação força frequência negativa no coração de peixes está provavelmente relacionada a uma redução do influxo de  $Ca^{2+}$  dependente da frequência, o que resulta em uma redução da liberação de  $Ca^{2+}$  (SHIELS *et al.*, 2002). A redução do influxo de  $Ca^{2+}$  pode afetar diretamente a  $[Ca^{2+}]_i$  em animais que não utilizam

reservas internas e pode reduzir a  $[Ca^{2+}]_i$  pelo mecanismo de liberação de cálcio induzida pelo cálcio em animais que utilizam o RS para ciclar o  $Ca^{2+}$  rotineiramente. A grande perda de força em altas frequências está provavelmente relacionada à restituição mecânica incompleta entre as contrações, que pode levar a elevações nas  $[Ca^{2+}]_i$  diastólicas e na tensão de repouso (SHIELS *et al.*, 2002).

A ampla plasticidade da função cardíaca exibida pelos vertebrados basais deve ser encarada como um sério desafio a ser desvendado em cada espécie. Tal plasticidade impõe restrições a generalizações em estudos da função cardíaca desses animais, devendo-se levar em consideração a utilização de diferentes técnicas que possam cobrir maior espectro de aspectos relevantes aos mecanismos relacionados ao acoplamento E-C e o seu contexto na biologia do organismo em questão.

## 1.5. MECÂNICA DA CONTRAÇÃO

Há aproximadamente um século, fisiologistas já procuravam entender a capacidade de trabalho cardíaco e para isso muitos foram os índices utilizados. Knowlton e Starling em 1912 utilizaram preparações isoladas de coração de cães e mediram o trabalho cardíaco pela pressão arterial, multiplicando o volume de sangue ejetado durante um dado período de tempo pela pressão naquele determinado período. Paterson, Piper e Starling em 1914 questionaram, em seu artigo clássico “The regulation of the heart beat”, as propriedades contráteis do coração e afirmaram que somente através de uma acurada análise mecânica da contratilidade cardíaca poderiam encontrar a solução para seus questionamentos. Em 1918 foi publicada a aula de Starling: “The Linacre Lecture on the Law of the Heart”, mais tarde conhecida como Lei de Frank-Starling (BRAUNWALD *et al.*, 1960).

As propriedades mecânicas de contração cardíaca foram cada vez mais elucidadas e tornaram-se referência para o estudo de condições patológicas, como o trabalho de Braunwald *et al.* em 1960, que estudaram pacientes com estenose mitral, fibrilação atrial e suas relações com a contração ventricular (BRAUNWALD *et al.*, 1960). Frank e Levinson em 1968 elaboraram um índice para avaliar o desempenho contrátil cardíaco em humanos, ressaltando sua importância para

diferenciar as alterações que ocorressem em função do comprimento da fibra daquelas relacionadas à capacidade contrátil, sendo de grande valor para identificação de pacientes com desenvolvimento de disfunção, antes que ocorresse a insuficiência cardíaca (FRANK; LEVINSON, 1968).

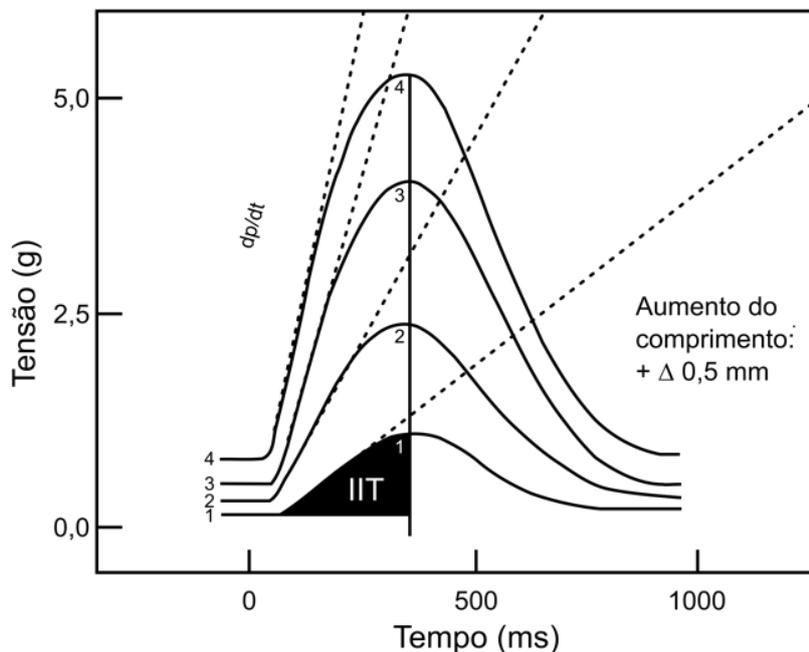
Para o desenvolvimento deste índice, Frank e Levinson basearam-se nos trabalhos de HILL (1938) e GIBBS *et al.* (1967), que trabalharam com preparações isométricas e isotônicas de músculo papilar ventricular de coelho em “*Thermopiles*”, aparelho capaz de utilizar a energia térmica emitida durante o relaxamento e a contração, juntamente com as medidas de tensão, para determinar o trabalho muscular. Frank e Levinson basearam-se também nos trabalhos de ABBOTT; MOMMAERTS (1958) e SONNENBLICK (1962 a, b), que usaram papilares ventriculares e relações entre desenvolvimento de força e velocidade de contração.

Em 1963 Siegel e Sonnenblick realizaram um trabalho investigativo utilizando preparações isométricas, procurando estabelecer uma relação entre tensão e tempo como índice para a contratilidade miocárdica. Nesse trabalho, os pesquisadores utilizaram preparações *in situ* de coração canino e analisaram a fase isovolumétrica (isométrica) de contração. A partir dos registros isométricos, foram calculadas as derivadas da tensão pelo tempo e a integral da tensão isométrica para a fase crescente de contração isométrica (Figura 3) (SIEGEL; SONNENBLICK, 1963).

Em 1972 Peterson e Lesch utilizaram preparações de papilar de coelho para estudar a síntese e transporte de aminoácidos enquanto a musculatura estava submetida a um regime de contração isométrica (PETERSON; LESCH, 1972). Para isso, utilizaram a tensão isométrica padronizada pela área da secção transversal (AST), determinando a unidade de  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ . Tal padronização assume que a tensão desenvolvida pela fibra é um estresse mecânico. Mais atualmente, SCHLOTTHAUER *et al.* (1998) utilizaram a força máxima normalizada pela AST ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) em seus registros isométricos de tiras cardíacas de pacientes com insuficiência cardíaca, além do tempo para o pico de tensão e tempo de relaxamento como parâmetros de estudo da contratilidade.

A fisiologia comparada que se dedicou a estudos de outros grupos de animais, mais especificamente dos vertebrados basais, usou algumas das metodologias derivadas das explorações das propriedades contráteis acima citadas.

**Figura 3.** Registros sobrepostos de contração isométrica do músculo papilar. Números de 1 a 4 indicam o aumento da tensão de repouso e a correspondente tensão desenvolvida.  $dp/dt$  = taxa máxima de desenvolvimento de tensão isométrica (linhas pontilhadas). IIT = Integral da tensão isométrica sistólica (área sombreada).



**Fonte:** Adaptado de SIEGEL; SONNENBLICK, 1963.

Um índice comumente utilizado é aquele derivado da tensão ou força máxima desenvolvida. Em 1978 Gesser e Poupa utilizaram a porcentagem da força máxima desenvolvida em função dos valores iniciais para estudar o efeito da acidose hipercápnica em vertebrados de respiração aérea e aquática (GESSER; JORGENSEN, 1982). A mesma metodologia foi utilizada para avaliar a contratilidade de diversos teleosteos e elasmobrânquios (DRIEDZIC; GESSER, 1988).

Pelouch e Vornanen em 1996 utilizaram a força máxima desenvolvida, o tempo para o pico de tensão (time to peak tension - TPT) e o tempo para a metade do relaxamento (time to half relaxation – THR) e adicionalmente as taxas máxima de desenvolvimento de força e máxima de relaxamento (porcentagem dos valores controle), para estudar as propriedades contráteis do coração da carpa cruciana (*Carassius carassius*) (PELOUCH; VORNANEN, 1996).

Em 1997 Shiels e Farrell utilizaram preparações de trabéculas ventriculares de truta arco-íris e calcularam o pico de tensão e a exemplo de Peterson e Lesch em 1972, normalizaram esse valor pela área de secção transversal chegando ao

estresse mecânico ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), além desse parâmetro foi utilizado no trabalho a razão entre o pico de tensão, TPT e THR para aproximações das taxas de contração e relaxamento (SHIELS; FARRELL, 1997).

Aho e Vornanen utilizaram em 1999 a tensão máxima desenvolvida para comparações de tiras ventriculares de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), padronizando as preparações em função da massa da tira, chegando a uma unidade de  $\text{mN}\cdot\text{mg}^{-1}$  (AHO; VORNANEN, 1999).

Para estudar a relação entre a disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$ , a temperatura e contratilidade dos miócitos cardíacos de truta arco-íris, COYNE *et al.* (2000) utilizaram o pico de força normalizado pela área de secção transversal ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), além de uma relação entre as variações de força ao longo do experimento em função da força máxima desenvolvida, chegando a uma fração de mudança na força ( $F/F_{\text{max}}$ ) como índice de avaliação.

SHIELS *et al.* (1999) e SHIELS; FARRELL (2000), ao estudarem a importância do RS no átrio de atum (*Yellowfinn tuna*) e em trabéculas ventriculares isoladas de cavala (*Scomber japonicus*), além de usarem o pico de tensão normalizado pela AST ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), utilizaram TPT, THR e a derivada da força pelo tempo ( $df/dt$ ) para calcular a taxa de contração e relaxamento. O trabalho não explica como foram feitos os cálculos. No entanto, como são apresentados dados únicos para cada curva de contração e relaxamento, espera-se que se trate da maior taxa de contração e maior taxa de relaxamento, ou seja, os maiores e menores valores obtidos da derivada da tensão isométrica pelo tempo.

Em 2002, Tiitu e Vornanen utilizaram a força máxima desenvolvida (normalizada pela contração inicial), TPT, THR e a taxa máxima de relaxamento ( $dF/dt_{\text{min}}$ ) para estudar a contratilidade cardíaca do “burbot” (*Lota lota*) (TIITU; VORNANEN, 2002)

RANTIN *et al.* (1998), COSTA *et al.* (2000), GESSER (2002) e ANELLI *et al.* (2004), realizaram comparações entre a porcentagem de alteração da tensão máxima produzida (% dos valores iniciais) e os valores de TPT e THR para estudar a contratilidade do amboré de poças de maré (*Bathygobius soporator*), da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), da truta arco-íris (*O. mykiss*) e do pacu (*Piaractus*

*mesopotamicus*), respectivamente. É interessante notar que, apesar da importância e relevância dos resultados apresentados nesses trabalhos, o desconhecimento dos valores absolutos de tensão não permite que sejam realizadas comparações diretas destes com outros trabalhos publicados contemporaneamente à eles ou mais recentes.

RIVAROLI *et al.* (2006), ROCHA *et al.* (2006 e 2007) e COSTA *et al.* (2004, 2005, 2008 e 2009) utilizaram os valores absolutos normalizados pela AST ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), além dos parâmetros do tempo com o TPT e THR, ao estudarem a contratilidade do miocárdio ventricular da traíra, do curimatá, do muçum (*Synbranchus marmoratus*), da pirambóia (*Lepidosiren paradoxa*), de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*), do jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) e do acará (*Geophagus brasilienses*). Similarmente, ao estudar os efeitos do neguvon® (inseticida organofosforado trichlorfon) na contratilidade ventricular da tilápia do Nilo, THOMAZ *et al.* (2009) utilizaram a força de contração normalizada pela AST ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), TPT, THR, calcularam a CPC e ainda fizeram aproximações da taxa de contração e relaxamento através do estudo da razão do TPT e THR pela força de contração (de acordo com CELICHOWSKI; BICHLER, 2002).

Como pôde ser percebido ao longo da história, o estudo da contração isométrica do músculo cardíaco apresentou muitas diferentes soluções para a análise do principal componente nesse tipo de preparação, a contratilidade. É interessante notar que muitas simplificações foram feitas por diversos pesquisadores as quais, apesar de servirem ao propósito de suas pesquisas, tornaram-se pobres no conteúdo de informação que a técnica permite obter. As análises mais refinadas, que integraram a noção de eficiência e valores absolutos permitem o conhecimento mais profundo da contratilidade, o que permite realização de conclusões mais sólidas, já que a base de dados que suporta as hipóteses é mais coesa.

## 1.6. ANÁLISE BIOMOLECULAR

A constituição dos anticorpos e seus fragmentos, com várias regiões de alças (*loops*) hipervariáveis, gera proteínas ligantes que são expressas pelos linfócitos a partir de sua ampla biblioteca gênica de motivos (UMETSU *et al.*, 2010). Todos os

anticorpos apresentam formato em Y, constituídos de duas cadeias pesadas ( $\cong$  440 aminoácidos) e duas cadeias leves ( $\cong$  220 aminoácidos) idênticas entre si. As cadeias leves no “braço” do anticorpo estão ligadas cada uma às cadeias pesadas por pontes dissulfeto. Em uma das extremidades estão seis *loops* altamente variáveis, chamados de região de determinação de complementariedade (*complementarity-determining regions*, CDRs). Os CDRs é que formam os sítios de ligação aos antígenos (LODISH *et al.*, 2003). Na extremidade oposta da “cauda” está a região Fc, responsável pela interação do anticorpo com células ou outros anticorpos (ALBERTS *et al.*, 2004).

A especificidade dos anticorpos pode ser tão grande que pode haver a distinção entre proteínas que diferem em um único aminoácido. Esta especificidade é explorada em experimentos para identificação de proteínas, como no *imunoblotting*, técnica também conhecida como *Western Blotting* (LODISH *et al.*, 2003), onde manchas (*blots*) são impressas em uma membrana segundo a quantidade de ligações antígeno-anticorpo. As regiões do anticorpo responsáveis por tal especificidade são as CDRs (*complementary determining regions*) e as regiões reconhecidas dos antígenos podem ser constituídas por menos de 25 aminoácidos, sendo denominadas epítomos ou determinantes antigênicos (ALBERTS *et al.*, 2004).

A ligação da CDR a um epítomo é reversível, sendo mediada pela soma das várias forças não-covalentes, como pontes de hidrogênio, forças hidrofóbicas de Van der Waals e interações iônicas. A afinidade de um anticorpo por um antígeno descreve o grau de ligação entre o CDR e o epítomo (ALBERTS *et al.*, 2004).

Em estudos de imunoblotting é interessante notar que apesar de um anticorpo poder ser específico para uma determinada proteína, variações relacionadas a ligação CDR-epítomo podem não alterar a especificidade, mas podem influenciar na afinidade da ligação e, conseqüentemente, a resolução e intensidade do “*blot*”

## 1.7. EVOLUÇÃO MOLECULAR

Nos últimos anos, os recentes avanços da biologia molecular permitem o uso cada vez mais frequente de técnicas moleculares para a investigação da variação morfológica, fisiológica e comportamental entre as espécies (BARTON *et al.*, 2007). Neste contexto, é possível hoje identificar mudanças evolutivas pela análise direta de sequências de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) ou proteínas. A evolução caracterizada ao nível molecular permite estabelecer, por exemplo, as relações filogenéticas entre organismos de forma objetiva e menos tendenciosa já que os mesmos métodos experimentais e modelos evolutivos podem ser testados para grupos de seres vivos tão diferentes quanto bactérias, plantas e animais.

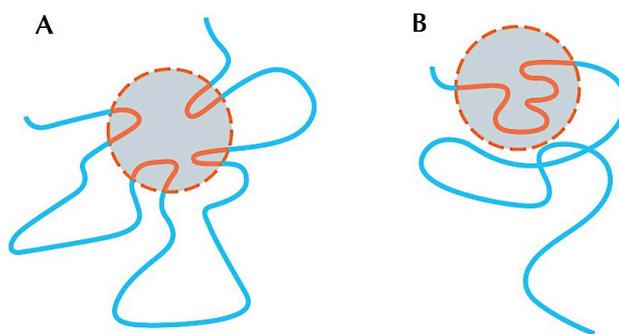
O acúmulo de dados moleculares demonstra que diferentes genes, ou diferentes partes do mesmo gene, frequentemente evoluem a diferentes taxas. Estas diferenças estão relacionadas à função do gene e os efeitos combinados da seleção natural e da deriva genética, forças evolutivas consideradas preponderantes ao nível molecular (KIMURA, 1983). A deriva genética pode ser definida como a flutuação aleatória na frequência alélica de genes; ela apresenta um efeito maior em populações menores, que sofreram, por exemplo, um gargalo populacional ou um efeito fundador. A seleção natural é uma força que age tanto em grandes quanto em pequenas populações e é responsável pelas adaptações que permitem a sobrevivência daqueles indivíduos que possuem maior valor adaptativo (i.e., sobrevivem mais e deixam maior número de descendentes) (BARTON *et al.*, 2007).

Os sítios ativos, regiões das proteínas relacionadas às atividades desempenhadas pelas mesmas, encontram-se frequentemente sob forte pressão seletiva e costumam ser altamente conservados (LUND *et al.*, 2005). Sítios ativos podem ocupar diferentes domínios na estrutura tridimensional das proteínas. Em proteínas multifuncionais, como a SERCA2a (110 kDa), por exemplo, sítios ativos costumam estar espaçados por regiões mais variáveis, que podem apresentar composição de aminoácidos diferentes. Proteínas podem ainda apresentar sítios ativos compostos por um único segmento de aminoácidos ou por vários segmentos que se combinam para formar o sítio ativo (Figura 4). Devido a essas características, a simples comparação da sequência de aminoácidos que compõe uma proteína

pode dizer pouco a respeito de sua função, sendo necessário conhecer a estrutura para realizar tais comparações.

O PLB, por outro lado, apresenta uma dimensão reduzida (25 kDa) e conseqüentemente deve apresentar fragmentos de seu gene evoluindo a baixas taxas, já que devem estar relacionados à função da proteína.

**Figura 4.** Representação esquemática do sítio ativo (vermelho) de proteínas que pode ser composto por diversos seguimentos da sequência primária que se aproximam quando a proteína encontra-se na forma tridimensional (A) ou consistir de um único trecho de aminoácidos da sequência primária (B). Em ambos os casos, as seqüências que compõe o sítio ativo tendem a ser conservadas em diferentes espécies.



**Fonte:** Adaptado de BARTON *et al.*, 2007.

Ao realizar o estudo comparativo de proteínas em organismos tão filogeneticamente distantes é necessário tomar o cuidado com as variações que podem ocorrer decorrente dos processos evolutivos. A biologia molecular pode fornecer os subsídios necessários para o suporte de tais estudos, tal suporte pode ter diversas origens, como os dados obtidos na bancada através de experimentos com genômica e proteômica ou ainda pela bioinformática, explorando a enorme quantidade de informação de genes e proteínas depositada em bancos de dados.

Por tudo o que foi exposto, a proposta do presente trabalho foi avaliar a contratilidade do miocárdio ventricular do *B. amazonicus*, confrontando diferentes metodologias de análise matemática para uma interpretação mais coesa da função cardíaca. A expressão de proteínas relacionadas ao manejo do  $\text{Ca}^{2+}$  no ciclo cardíaco pretendeu validar e compreender os resultados obtidos com os estudos de contração isométrica. A análise molecular das proteínas estudadas emergiu como uma necessidade à validação das comparações, mediante a hipótese de seu alto grau de conservação.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos gerais o teste da validade de índices utilizados na análise da contratilidade isométrica através do estudo da função cardíaca do matrinxã, *Brycon amazonicus*, bem como a análise da expressão das proteínas SERCA2a e fosfolambano, peças fundamentais em miócitos que utilizam os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS no ciclo de contração e relaxamento. A validade dos estudos de *Western Blot* foi investigada pela similaridade entre as proteínas homólogas.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

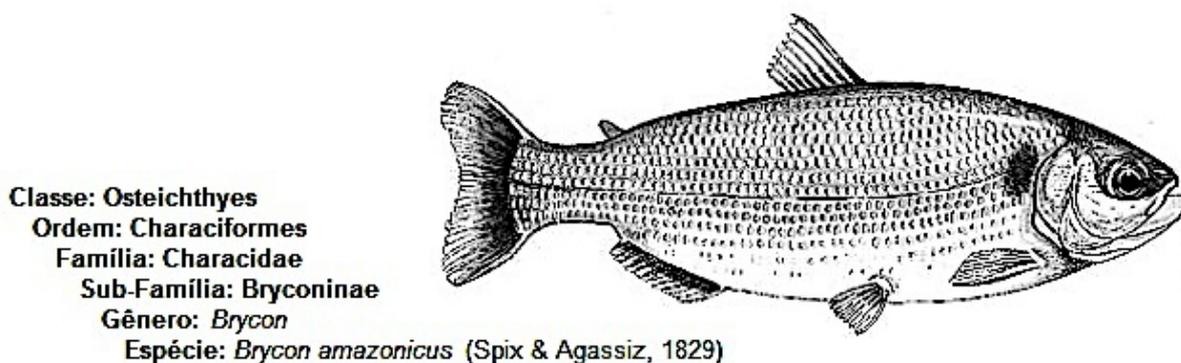
- Testar a validade da utilização dos tempos absolutos da contração isométrica (TPT e THR) como índice de contratilidade em contraposição à utilização de índices que integrem ambas as grandezas força e tempo, como taxas de contração e relaxamento;
- Avaliar se a utilização do índice de tensão máxima desenvolvida (estresse isométrico) para a construção de outros índices é válida;
- Calcular a quantidade total de tensão desenvolvida na contração isométrica e avaliar seu significado e a validade da sua utilização;
- Elaborar e avaliar um índice para estudo da contratilidade baseado no significado fisiológico de cada parâmetro da contração isométrica;
- Verificar a presença das proteínas SERCA2a e fosfolambano pela técnica de *Western Blot* no miocárdio ventricular do *B. amazonicus*;
- Estudar, pela evolução molecular, a validade do estudo do *Western Blot* com anticorpos desenvolvidos em organismos filogeneticamente distantes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ESPÉCIE ESTUDADA

A espécie *Brycon amazonicus*, conhecida popularmente como matrinxã, está taxonomicamente incluída dentro da classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Characidae (Figura 5). Enquanto as mais de 40 espécies do gênero *Brycon* encontram-se amplamente distribuídas na região biogeográfica Neotropical (LIMA, 2003), *Brycon amazonicus* possui distribuição restrita à bacia Amazônica (HOWES, 1982). A espécie é morfologicamente e citogeneticamente muito similar à *B. cephalus*, tendo sido confundida com a mesma até a recente revisão feita por LIMA (2003).

**Figura 5.** Ilustração de um exemplar de *B. amazonicus* e sua classificação taxonômica.



Fonte: FROESE; PAULY (1990-2008).

A espécie ocupa habitats diversificados ao longo do seu ciclo de vida (e.g. rios, lagos e florestas inundadas) e apresenta comportamento reprodutivo migratório e hábito alimentar onívoro (GOMES; URBINATI, 2005). É considerada ainda uma espécie ecologicamente importante por ser dispersora de frutas e sementes de espécies vegetais dos igarapés amazônicos. A pesca exploratória desta espécie acontece principalmente no Brasil, Colômbia e Venezuela. Devido ao seu hábito onívoro e rápido crescimento, o matrinxã é considerado uma espécie interessante do ponto de vista da aquicultura, sendo apreciado tanto para o consumo humano e como para pesca esportiva (LOPERA-BARRERO, 2009). Do ponto de vista da conservação, embora a espécie seja superexplorada em algumas partes da sua distribuição, a mesma encontra-se classificada como “*least concern*” na lista

vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) (REIS; LIMA, 2007). Programas de criação em cativeiro desta espécie para repovoamento das populações naturais estão sendo desenvolvidos principalmente no Brasil e na Venezuela.

### 3.2. PREPARAÇÕES EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

Vinte (20) exemplares de *Brycon amazonicus*, foram cedidos pela piscicultura Águas Claras, localizada na cidade de Mococa, (São Paulo), à aproximadamente 150 Km de São Carlos. Após a coleta, os peixes foram acondicionados em tanques com capacidade de 150 L e imediatamente transportados ao Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LBZC) do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, onde os experimentos foram conduzidos. Durante o transporte os peixes receberam borbulhamento de oxigênio (O<sub>2</sub>) em intervalos de 1 hora para manter a tensão de oxigênio adequada para a sobrevivência dos espécimes.

No LBZC, os espécimes foram mantidos por um período mínimo de 4 semanas em tanques de 1000 L para aclimação, tais tanques possuem aeração constante e fazem parte de um sistema com circulação fechada e contínua onde a água é reciclada, sendo para isso, filtrada (filtro físico e biológico) e aquecida (controle de temperatura de 25 ±1 °C). Quando necessário, o sistema recebe suprimento externo de água decolorada. Durante o período de aclimação os animais receberam ração comercial própria para peixes, *ad libitum*, uma vez por dia e foram mantidos em fotoperíodo natural com ciclo claro/escuro de aproximadamente 12 horas.

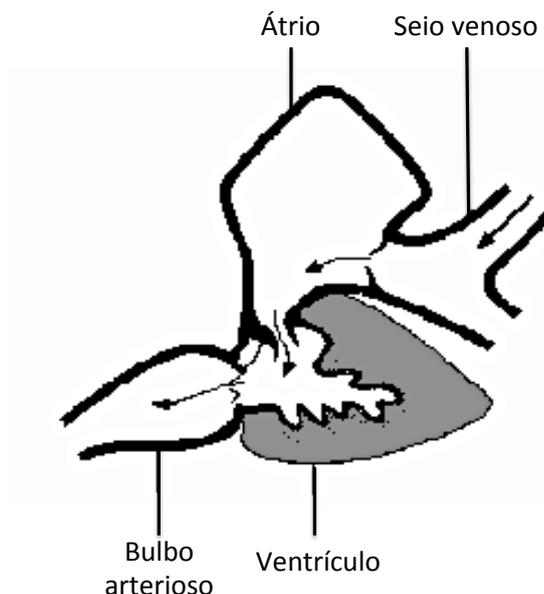
As preparações para os experimentos *in vitro* foram efetuadas de acordo com os procedimentos inicialmente propostos por Gesser (1977), com as modificações detalhadas a seguir. Os cálculos para os resultados dos experimentos *in vitro* foram realizados a partir dos dados obtidos conjuntamente com C.D. Olle (2007), com sua permissão.

Os animais foram eutanasiados por meio de secção da medula espinhal e pesados. O método de secção da medula está de acordo com àqueles aceitos sob

restrição pela resolução nº 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Nacional de Medicina Veterinária. É aceita sob restrição pois, a utilização de anestésicos pode interferir na função cardíaca e, para promover a perda de consciência com o mínimo de sofrimento é necessário experiência na manipulação dos animais e na realização do método de eutanásia.

Foi feita uma incisão longitudinal na porção ventral do animal e o coração, localizado entre as nadadeiras peitorais foi retirado e colocado imediatamente em solução fisiológica fria própria para peixes teleósteos (NaCl 125 mM, KCl 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,94 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 10 mM). Quando necessário, o pH da solução foi ajustado para 7,4 com NaOH ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A solução fisiológica recebeu borbulhamento constante de mistura carbogênica (98% O<sub>2</sub> e 2% CO<sub>2</sub>), que além de suprir a solução com o oxigênio necessário para os processos de respiração celular, também atua para no equilíbrio do pH com o CO<sub>2</sub>.

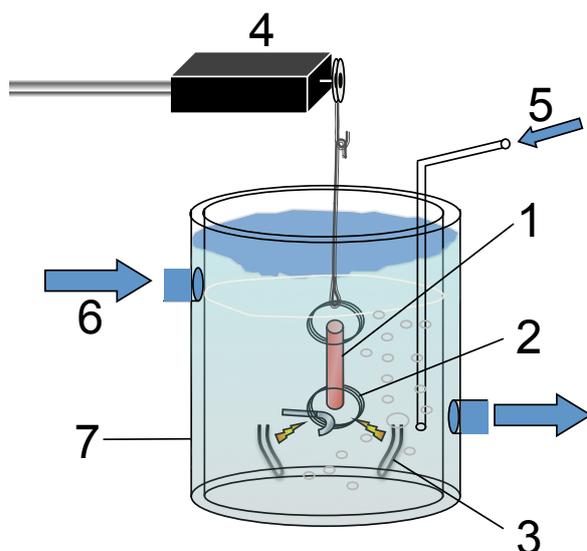
O coração dos teleósteos é constituído de quatro câmaras em série: seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso (Figura 6). É importante ressaltar a morfologia cardíaca de peixes, pois as células marca-passo, localizadas, em sua maioria, no tecido atrial, devem ser removidas completamente durante a preparação das tiras, pois são capazes de disparar contrações espontâneas, que podem prejudicar o controle da frequência de estimulação, necessário para a realização dos protocolos experimentais.

**Figura 6.** Anatomia do coração de peixes teleósteos.

**Fonte:** Adaptado de FARRELL; JONES, 1992.

A partir do ventrículo foram obtidas tiras musculares, com espessura de aproximadamente de 1 a 2 mm, com massa média de  $4,20 \pm 0,45$  mg (MÉDIA  $\pm$  erro padrão médio, E.P.M.) e comprimento médio de  $3,8 \pm 0,14$  mm (MÉDIA  $\pm$  E.P.M.). O cuidado com a espessura da tira foi proposto por Jordi Altimiras e Hans Gesser, em estudos com truta-arco-íris, onde foi demonstrado que tiras ventriculares com espessuras menores ou iguais a 1 mm não apresentam problemas difusionais até a região mais profunda da tira, prevenindo a ocorrência de um núcleo hipóxico na preparação e uma consequente perda da força contrátil ao longo do experimento (SHIELS *et al.*, 2002).

As extremidades de cada tira ventricular foram fixadas, por pressão, entre os elos de pequenas argolas circulares de aço inox. Uma das extremidades da tira foi presa a um gancho de aço inox construído no interior do banho e a outra, por meio de um fio de aço inox foi fixada a um transdutor de força isométrica Letica (LETICA Scientific Instruments, Spain; Figura 7).



**Figura 7.** Esquema do banho de solução fisiológica. Tira ventricular fixada por pressão (1); argola circular de aço inox (2); eletrodos de estimulação (3); transdutor de força (4); borbulhamento de mistura carbogênica (5); entrada de água em temperatura controlada (6); cubeta termostaticada (7).

Fonte: RIVAROLI, L.

No banho, eletrodos de platina acoplados a estimuladores elétricos AVS 100D (Solução Integrada Ltda., Brasil) geram pulsos elétricos quadrados com 8 ms de duração e uma voltagem 50% superior àquela correspondente ao limiar da resposta mecânica. Essa padronização da estimulação elétrica se faz necessária, pois apesar da utilização de uma quantidade mínima de descarga, esta possibilita o desenvolvimento da força de contração máxima a diferentes taxas de estimulação e ainda previne danos teciduais, o que poderia comprometer os resultados do experimento.

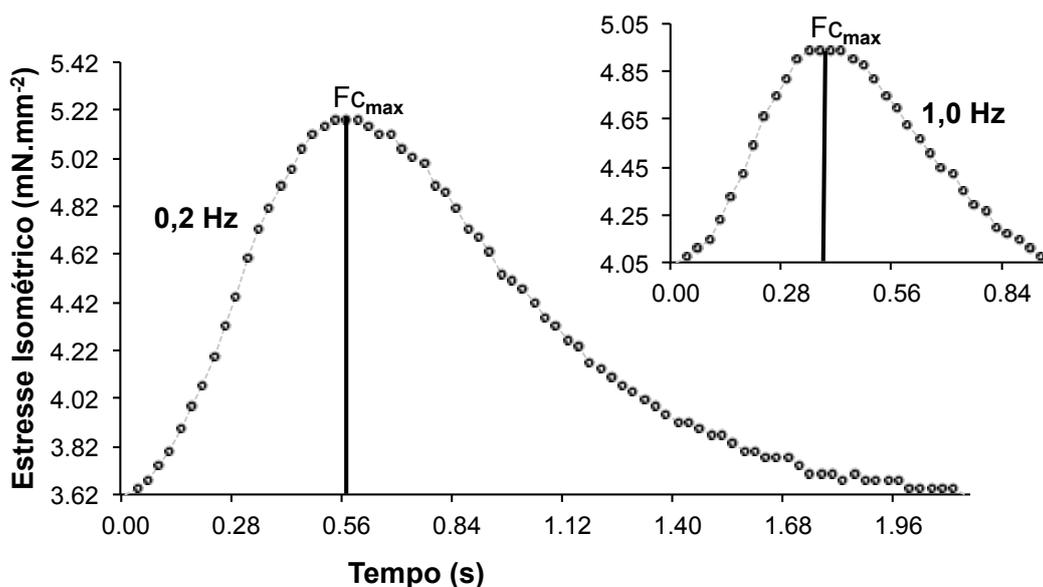
Após a fixação ao transdutor de força, as tiras foram levemente estiradas e seguiu-se o período de estabilização, onde as tiras foram estimuladas a 0,2 Hz por aproximadamente 30 minutos passando a exibir contrações uniformes.

Após atingir a uniformidade das contrações, as preparações foram estiradas gradativamente, utilizando-se um micromanipulador. Aumentou-se a distância entre o transdutor de força e o gancho de fixação no interior da cubeta até que uma relação máxima entre o comprimento da preparação e o pico de tensão pudesse ser obtida com uma estimulação basal constante de 0,2 Hz. Este estiramento foi efetuado para que fosse alcançado um comprimento do sarcômeros que permita a ocorrência do maior número possível de interações actino-miosínicas, além de tentar diminuir o impacto da orientação celular indefinida da preparação (HARTMUND; GESSER, 1996) e criar um referencial de relaxamento máximo, o qual será atribuído

a esse valor mínimo de tensão de estiramento, ou, denominado ainda como tensão de repouso (RT).

Para o registro da tensão nos experimentos *in vitro*, o sinal do transdutor de força foi enviado a um amplificador de sinais AECAD 0408 (Soft&Solutions/Solução Integrada Ltda. São Paulo, SP). O sinal amplificado foi enviado a um terminal de computador onde o programa KitCad (Soft&Solutions/Solução Integrada - Ltda., São Paulo, SP) permitiu a visualização e gravação da variação de tensão. Os valores de tensão foram plotados pelo programa em função do tempo, de forma que, os resultados experimentais puderam ser visualizados como um sistema cartesiano de coordenadas, onde o eixo das ordenadas (Y) foi representado pelos valores de tensão obtidos pelo sistema e as abcissas (X) pelos valores do tempo decorrido durante aquele dado registro (Figura 8). A cada registro realizado, o programa KitCad gerou dois tipos de arquivos distintos: um arquivo contendo as anotações das manipulações experimentais realizadas, que apresentava extensão “.log”, e um arquivo de texto, com extensão “.das”, com as coordenadas “valor da tensão” e “valor do tempo” organizadas com separadores “tabulação” e “linha”.

**Figura 8.** Plotagem dos valores de tensão de arquivos “.das” no Microsoft Excel<sup>®</sup>, já normalizados pela AST. Os gráficos exemplificam curvas em diferentes frequências de estimulação, 0,2 e 1,0 Hz. As curvas foram plotadas na mesma escala.



Fonte: RIVAROLI, L.

### 3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 3.3.1. EFEITO DO TEMPO

As preparações ventriculares foram estimuladas à 0,2 Hz ininterruptamente por 40 minutos a 25 °C, temperatura em que a espécie é observada no ambiente e na qual foi mantida no período de aclimatação no laboratório. Esse protocolo pretendeu avaliar a ocorrência de uma deterioração da capacidade de geração de tensão no decorrer do período experimental. No caso da identificação de tal deterioração os protocolos experimentais seguintes deveriam ocorrer dentro dos limites de tempo para não haver comprometimento dos resultados, caso contrário, seria necessário a contabilização da queda de tensão, tendo como referência o protocolo do efeito do tempo.

#### 3.3.2. RELAÇÃO FORÇA-FREQUÊNCIA

O mesmo procedimento experimental anteriormente descrito foi adotado, porém, após o registro de contração a 0,2 Hz, a taxa de estimulação foi aumentada gradativamente em 0,2 Hz. Em cada nova taxa de estimulação, após alcançar a uniformidade foram realizados novos registros. A frequência foi elevada até atingir uma taxa de estimulação máxima com registros regulares. Foi a considerada frequência máxima quando pelo menos 60% das preparações apresentaram contrações regulares.

Este protocolo além de permitir a investigação da produção de força em diferentes frequências de trabalho, permite realizar medidas de possíveis variações no desempenho dos miócitos por meio de parâmetros dependentes do tempo, taxas de contração, relaxamento e quantidade de tensão produzida.

### 3.3.3. PARTICIPAÇÃO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO NO CICLO CARDÍACO

Para testar a participação das reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , mais especificamente para testar a participação do retículo sarcoplasmático, no acoplamento excitação-contração, adicionou-se 10  $\mu\text{M}$  de rianodina ao banho de solução fisiológica 30 minutos anteriores ao aumento de frequência. Esse alcalóide que pode bloquear a saída do  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais de rianodina do RS, ou ainda, mantê-los em condição de subcondutância, impede a utilização das reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS durante o ciclo cardíaco. Vários estudos, com musculatura cardíaca de peixe ou mamífero, demonstraram a eficiência da concentração de 10  $\mu\text{M}$  de rianodina para reduzir a importância funcional do RS no acoplamento E-C (DRIEDZIC; GESSER, 1988; TIBBITS *et al.*, 1992; HOVE-MADSEN, 1992; KEEN *et al.*, 1994; HARTMUND; GESSER, 1996; VORNANEN, 1996; BERS, 2001).

### 3.4. TRATAMENTO DOS DADOS

Para padronização entre as diferentes preparações, os valores obtidos foram normalizados em função da área de secção transversal (AST,  $\text{mm}^2$ ) de cada tira ventricular utilizada. Para o cálculo da AST foram utilizados os valores de massa (g) e comprimento (mm), considerando para tal uma densidade muscular de  $1,06 \text{ g.cm}^{-3}$  (LAYLAND *et al.*, 1995). Com a padronização da tensão em função da AST, são levadas em consideração dois importantes fatores no processo de geração de tensão: a massa muscular, que corresponde diretamente ao número de miócitos presentes e o comprimento da preparação, que está relacionado à distribuição dos miócitos ao longo do eixo em que é gerada tensão.

O estresse isométrico (EI,  $\text{mN.mm}^{-2}$ ) foi então calculado pela diferença entre os valores de tensão máxima ( $F_{C_{\text{max}}}$ ) e tensão de repouso (RT) dividido pela respectiva AST:

$$EI = \frac{Fc_{\max} - RT}{AST}$$

onde:

$Fc_{\max}$  = valores de tensão máxima da onda de contração (mN);

RT = tensão de repouso (mN);

AST = área de secção transversal (mm<sup>2</sup>).

O tempo para o pico de tensão (TPT), correspondente ao intervalo de tempo entre o início da geração de tensão e a tensão máxima desenvolvida ( $Fc_{\max}$ ) foi medido para avaliar o desempenho da contração. A partir do EI e TPT foi calculada a taxa de contração TC (mN.mm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), resultado da divisão do EI pelo TPT:

$$TC = \frac{EI}{TPT}$$

onde:

EI = estresse isométrico (mN.mm<sup>-2</sup>);

TPT = tempo para o pico de tensão (s)

Esse cálculo permitiu observar como foi o desenvolvimento de tensão ao longo do processo de contração.

Foi medido também o intervalo de tempo necessário para reduzir a  $Fc_{\max}$  pela metade, tempo para metade do relaxamento (THR). Além do THR ser utilizado para caracterizar a função cardíaca, foi utilizado também para o cálculo da taxa inicial de relaxamento (TIR), já que corresponde à metade inicial do processo. Para o cálculo da TIR (mN.mm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) foi utilizada a metade do valor do EI dividido pelo correspondente THR:

$$TIR = \frac{\frac{EI}{2}}{THR}$$

onde:

EI = estresse isométrico ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ );

THR = tempo para metade do relaxamento a partir do pico de tensão (s)

O produto do estresse isométrico pela frequência de estimulação foi calculado para estudo da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ) de acordo com MATIKAINEN; VORNANEN (1992):

$$CBC = EIn \times (fHn \times 60)$$

onde:

EIn = estresse isométrico em uma dada frequência n de estimulação ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ );

fHn = frequência n de estimulação (Hz).

As coordenadas de tensão e tempo contidas nos arquivos “.das” foram utilizadas para o cálculo da curva da derivada da tensão isométrica pelo tempo ( $dTI/dT(n)$ ,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), cada ponto da curva representa a taxa instantânea de desenvolvimento de tensão:

$$\frac{dTI}{dT}(n) = \frac{TIn + 1 - TIn}{Tn + 1 - Tn}$$

onde:

TIn+1 = tensão isométrica em um dado ponto n+1 da curva ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ );

TIn = tensão isométrica em um dado ponto n da curva ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ );

Tn+1 = tempo decorrido em um dado ponto n+1 da curva;

Tn = tempo decorrido em um dado ponto n da curva.

Para estudar as capacidades de contração e relaxamento ventricular, foram utilizadas as taxas máximas de contração e de relaxamento (TMC e TMR,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e taxas média de contração e relaxamento (TMedC e TMedR,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Os valores de TMC e TMR correspondem aos valores extremos da derivada da derivada

da tensão isométrica pelo tempo na fase de contração e relaxamento respectivamente. Os valores de TMedC e TMedR foram obtidos com o cálculo da média entre os valores da derivada da tensão isométrica pelo tempo na fase de contração e relaxamento, respectivamente (Figura 9):

$$TMedC = \frac{\sum_{i=0}^{TPT} \frac{dT_I}{dT}}{n}$$

e

$$TMedR = \frac{\sum_{i=TPT}^{THR} \frac{dT_I}{dT}}{n}$$

onde:

$dT_I/dT(n)$  = taxa instantânea de desenvolvimento de tensão ( $mN.mm^{-2}.s^{-1}$ );

TPT = Tempo para o pico de tensão;

THR = Tempo para metade do relaxamento.

As coordenadas de tensão foram também utilizadas para o cálculo da integral da tensão isométrica pelo tempo, ITI ( $\int EI dT$ ,  $mN.mm^{-2}.s$ ), que representa a quantidade total de tensão desenvolvida durante a onda de contração e relaxamento (Figura 9):

$$\int T_I dT = \sum_{i=1}^n (T_I n) \times [(T_{n+1}) - (T_n)]$$

onde:

$T_I n$  = tensão isométrica em um dado ponto n da curva ( $mN.mm^{-2}$ );

$T_{n+1}$  = tempo decorrido em um dado ponto n+1 da curva (s);

$T_n$  = tempo decorrido em um dado ponto n da curva (s).

A Integral da tensão isométrica pelo tempo (ITI) foi calculada pelo método da somatória dos retângulos, correspondente à área entre a curva de tensão isométrica e o valor de tensão de repouso dentro de um intervalo de tempo. Para permitir comparações com a CBC, foi considerado a ITI para o total de contrações no período de 1 minuto, sendo denominada integral da tensão isométrica por minuto - ITIPM ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}$ ):

$$ITIPM = ITIn \times (fHn \times 60)$$

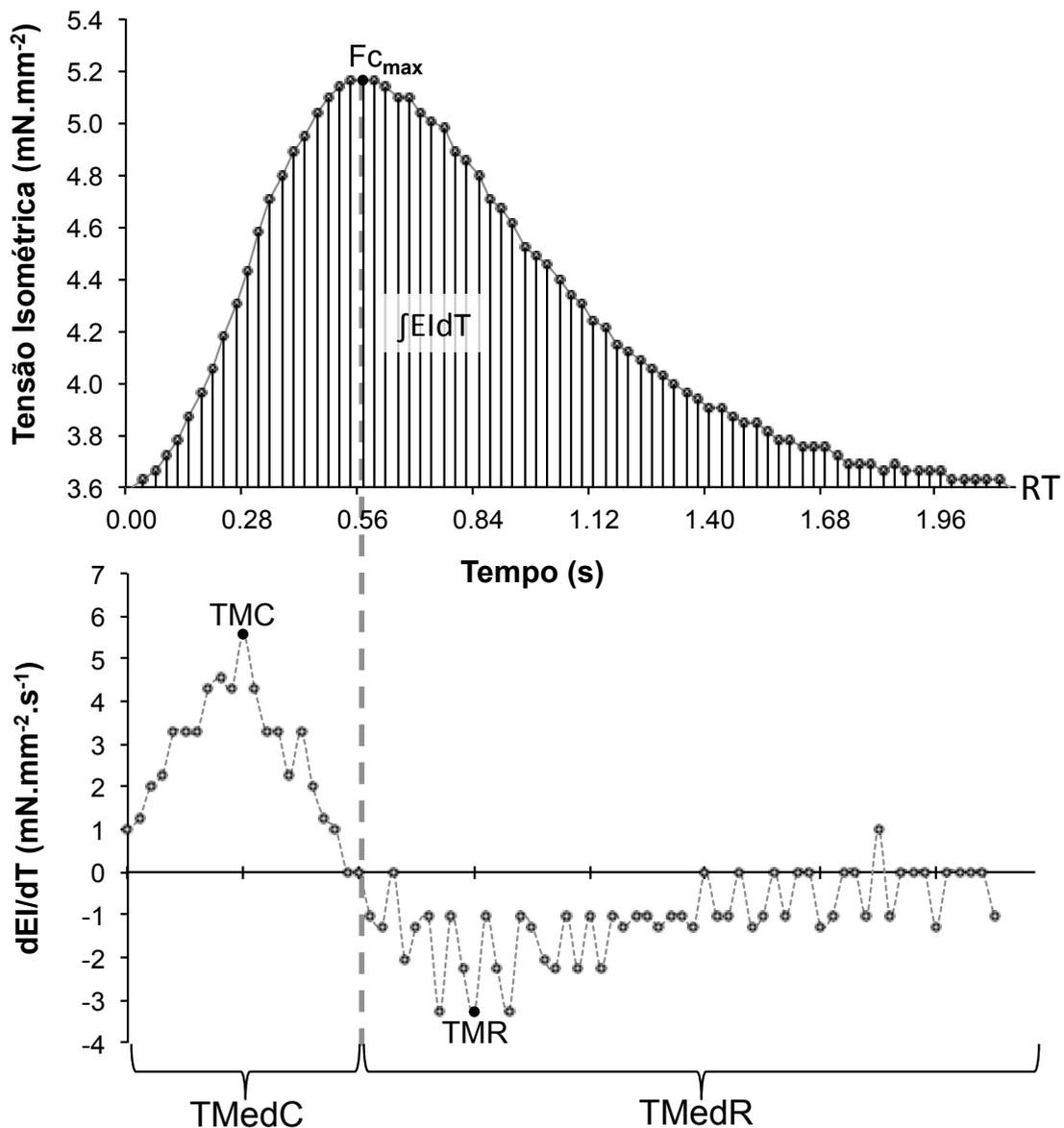
onde:

ITIn = Integral da tensão isométrica pelo tempo em uma dada frequência n de estimulação ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}$ );

fHn = frequência n de estimulação (Hz).

É interessante notar que os índices anteriores contam apenas com um fragmento pontual da informação da onda de tensão desenvolvida durante os experimentos isométricos (EI, CBC), ou ainda, contam com a tensão desenvolvida numa fase da onda, que não representa o trabalho pulsátil do coração na fase de relaxamento, quando válvulas impediriam o refluxo e o ventrículo estaria na fase de relaxamento, anterior ao enchimento diastólico.

**Figura 9.** Parâmetros da contratilidade analisados. No gráfico superior os valores mínimos indicam a tensão de repouso (RT), a tensão máxima ao longo da onda de contração determina o estresse isométrico (EI), a área entre a curva de tensão e a RT representa a integral da onda de contração ( $\int EI dt$ ). No gráfico inferior temos a derivada da curva de tensão, onde são indicadas as taxas máximas de contração e relaxamento (TMC e TMR, respectivamente). São indicados também os pontos utilizados para o cálculo da TMedC, na fase da onda de contração que corresponde à contração (à esquerda da linha pontilhada) e os pontos para o cálculo da TMedR, na fase correspondente ao relaxamento (à direita da linha pontilhada).



Fonte: RIVAROLI, L.

Para explorar a capacidade de bombeamento foi criado um novo parâmetro para o estudo do desempenho cardíaco, o índice de contratilidade (IC,  $mN.mm^{-2}$ ). Para tanto, foi levado em consideração uma correlação direta da amplitude máxima da onda de contração (EI), uma correlação inversa do tempo para o

desenvolvimento dessa tensão (TPT) e a quantidade de tensão desenvolvida até essa dada amplitude máxima de contração ( $\int TIdt$ ,  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}$ ), assim:

$$IC = \int_0^{TPT} TIdt \times \left(\frac{EI}{TPT}\right)$$

Onde:

$\int_0^{TPT} TIdt$  = Integral da tensão isométrica até o tempo para o pico de tensão ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}$ );

EI = estresse isométrico ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ );

TPT = tempo para o pico de tensão (s).

Para permitir comparações com o CBC e ITIPM, foi realizado o cálculo do IC por minuto (ICPM –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) em cada frequência de estimulação:

$$ICPM = ICn \times (fHn \times 60)$$

onde:

ICn = Índice de contratilidade em uma única contração numa dada frequência n de estimulação ( $\text{mN}^2\cdot\text{mm}^{-4}$ );

fHn = frequência n de estimulação (Hz).

### 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média). Com os valores obtidos a partir de um mesmo protocolo experimental foi realizada uma análise de variância de uma via (ANOVA), e posterior comparação dos dados de um mesmo protocolo experimental (matriz completa de dados), usando o teste de Dunnet de comparações múltiplas. Caso a matriz de dados não tenha sido completada (e.g. quando algumas preparações experimentais não

atingiram a frequência máxima de estimulação) o teste-T de Student pareado foi utilizado para comparações entre valores de um mesmo protocolo. Além disso, as diferenças entre as comparações de valores obtidos em diferentes protocolos foram avaliadas com o teste-T de Student não pareado

O método de Kolmogorov e Smirnov foi aplicado para avaliar a normalidade das amostras e o Teste F foi utilizado verificar homogeneidade das variâncias. Adicionalmente, a correção Welch foi feita, quando as amostras de diferentes protocolos não apresentaram variâncias semelhantes. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad InStat versão 3.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Foram consideradas somente as diferenças ao nível de 5% de significância ( $P < 0,05$ ).

### 3.6. WESTERN BLOT

Para a realização dos experimentos de expressão protéica, 10 espécimes de *B. amazonicus* foram eutanasiados no LBZC do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar e seus corações foram removidos e os ventrículos imediatamente isolados. Esses foram lavados com solução fisiológica fria (descrita anteriormente), colocados em microtubos de 2 mL e estocados em ultrafreezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para o transporte dos tecidos até o Laboratório de Fisiologia Vascular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), da Universidade de São Paulo, o mesmo foi acondicionado em uma caixa térmica (isopor) com volume de 3 L, contendo gelo seco (cedido gentilmente pela empresa Tecumseh do Brasil, São Carlos, SP), sendo em seguida novamente armazenados em ultrafreezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.6.1. HOMOGENEIZAÇÃO DO MÚSCULO CARDÍACO

Os ventrículos congelados ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) de *B. amazonicus* e de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), utilizados como controle positivo, foram pesados, para serem homogeneizados. Para homogeneização procurou-se respeitar uma relação de 1 mg de tecido para 1  $\mu\text{L}$  de tampão. Para a elaboração do homogenato de ventrículo de

peixe foi utilizado aproximadamente 500 mg de tecido em 500  $\mu$ L de tampão, como a massa de cada ventrículo de *B. amazonicus* era reduzida ( $\cong$  120mg), foi necessário utilizar um *pool* de ventrículos da espécie em questão para atingir as proporções de massa de tecido por volume de tampão desejados. Para o ventrículo de rato foi utilizada a porção apical do ventrículo esquerdo em 400  $\mu$ L de tampão.

Foram feitos dois procedimentos distintos de homogeneização: um para a preparação de amostras com o a fração celular total e outro para amostras com a fração microssomal. Para as amostras da fração celular total foi utilizado o tampão de extração (vanadato sódico 1 mM; SDS 1%; Tris-HCl 10 mM pH 7,4) e para as amostras da fração microssomal foi utilizado um tampão hiperosmótico, adequado para a posterior ultracentrifugação (Sacarose 250 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM pH 7,4).

Os ventrículos de *B. amazonicus* foram seccionados em pequenos fragmentos e inseridos gradativamente no tubo para homogeneização por pistão de vidro. Foi utilizado tampão gelado e o tubo contendo a amostra foi mantido no gelo durante todo o procedimento. O homogenato de ventrículo do rato Wistar foi obtido com a utilização do homogeneizador Polytron<sup>®</sup> (ruptura do tecido por corte com lâminas e cavitação), sendo mantido no gelo durante todo o procedimento, sendo neste caso, executada a velocidade máxima em 3 pulsos de aproximadamente 10 s.

O homogenato obtido com o uso de ambos os tampões de extração foi vertido em microtubos e centrifugados a uma força de 10000 G por 40 min a 4 °C para remover células intactas, fragmentos celulares e frações ricas em partículas de origem nuclear, citoesquelética e mitocondrial (NECKÁR *et al.*, 2005). Em seguida, o sobrenadante foi colhido e o precipitado descartado.

Nas amostras utilizadas para obtenção da fração microssomal, o sobrenadante foi levado a ultra-centrifugação com força de 100000 G a 4 °C por 60 min. Após a ultra-centrifugação o sobrenadante, que representa a fração citosólica, foi descartado, as vesículas microssomais que constituem a fração com maior densidade (após a separação prévia) encontraram-se no precipitado na forma de uma densa massa ao fundo do tubo, denominado *pellet*. Os *pellets* de cada tubo foram ressuspensos em um volume reduzido (100 a 150  $\mu$ L) de tampão Tris-EDTA (Tris 50 mM; EDTA 1 mM; pH 7,4).

### 3.6.2. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

A quantificação de proteínas foi realizada baseado no método de BRADFORD (1976), utilizando o kit para medida de proteínas da Bio-Rad. Esse método envolve adição de um corante ácido a uma solução de proteínas e a subsequente medida da intensidade de reação na amostra com um espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Cada amostra foi diluída em tampão Tris-EDTA na proporção de 1:100 (1  $\mu$ L amostra e 99  $\mu$ L tampão Tris-EDTA). Foram utilizados 10  $\mu$ L da amostra diluída em cada poço da placa de Elisa e a esse volume acrescentou-se 200  $\mu$ L de Bradford.

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando-se placa Elisa e uma escala gradual de concentrações de proteína, para construção de uma curva padrão, utilizada como referência para a quantificação das amostras. Para esta curva de proteínas foi utilizada uma solução de albumina do soro bovino (BSA - *Bovine Serum Albumin*), na concentração conhecida de  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A BSA foi adicionada em quantidades crescentes nos poços da placa Elisa (0, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu$ L), sendo completados para 10  $\mu$ L com tampão Tris-EDTA. A cada poço foi acrescentado 200  $\mu$ L de Bradford para reação com as proteínas e posterior leitura no espectrofotômetro.

Nesse procedimento o reagente de Bradford foi o último a ser adicionado na placa de Elisa, que em seguida permaneceu por um período de 10 minutos no escuro antes da leitura no espectrofotômetro. Este procedimento foi adotado para que ocorresse a reação do corante com as proteínas da solução e para prevenir a degradação do corante pela ação da luz.

### 3.6.3. ELETROFORESE

Após a quantificação de proteína das amostras, foi determinado o volume a ser depositado em cada poço do gel de acordo com a quantidade de proteína desejada em cada corrida. A cada poço foi adicionado, além da amostra, igual volume de tampão de Laemmli (uréia 3g; SDS 500 mg; DTT 600 mg; Tris 1 M pH 8,0 500  $\mu$ L; alguns cristais de azul de bromofenol e água destilada q.s.p. 10 mL).

A um dos poços foi adicionado o marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Prestained Standards, Dual Color – Bio-Rad), resultando em bandas de diferentes pesos moleculares (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 e 250 kDa) coradas para o referencial da corrida das amostras.

Para a construção do gel *stacking*, foram utilizados pentes para 10 poços, com espessura de 1,5 mm, permitindo a utilização de amostras com volume de até 50 µL (volume da amostra + volume do tampão de Laemmli).

Para elaboração do gel *Resolving* levou-se em conta o peso molecular da proteína a ser analisada, que deve atravessar a malha do gel enquanto migra ao longo do gradiente elétrico (Tabela 1). No caso da SERCA2a, uma proteína com 1043 aminoácidos e peso molecular de 110 KDa, foi confeccionado um gel 7,5% de poliacrilamida (mesma densidade de geles utilizada na literatura para analisar a expressão da SERCA2 de outros teleósteos, no caso, atum e cavala; Landeira-Fernandez *et al.*, 2004) . Para o Fosfolambano, uma proteína com 52 aminoácidos e peso molecular de 25 kDa, foi confeccionado um gel de 10% de poliacrilamida.

**Tabela 1.** Composição do Gel Resolving de poliacrilamida, com densidades diferentes (7,5 e 10%) para a eletroforese de cada proteína estudada (SERCA2a e Fosfolambano, respectivamente). As quantidades na tabela são referentes à confecção de 2 géis de 1,5mm de espessura no sistema Mini-Protean da Bio-Rad. Buffer 1: Tris 18,17 g; SDS 10% 4 mL; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100 mL e pH final 8,8.

	(7,5%)	(10%)
H <sub>2</sub> O	8,22 ml	7,16 ml
Buffer 1	4,26 ml	4,26 ml
Acrilamida 40%	3,16 ml	4,21 ml
Glicerol 50%	1,15 ml	1,15 ml
APS 10%	63,76 µL	63,76 µL
TEMED	5,62 µL	5,62 µL
Volume total	16,86 ml	17,91 ml

Fonte: RIVAROLI, L.

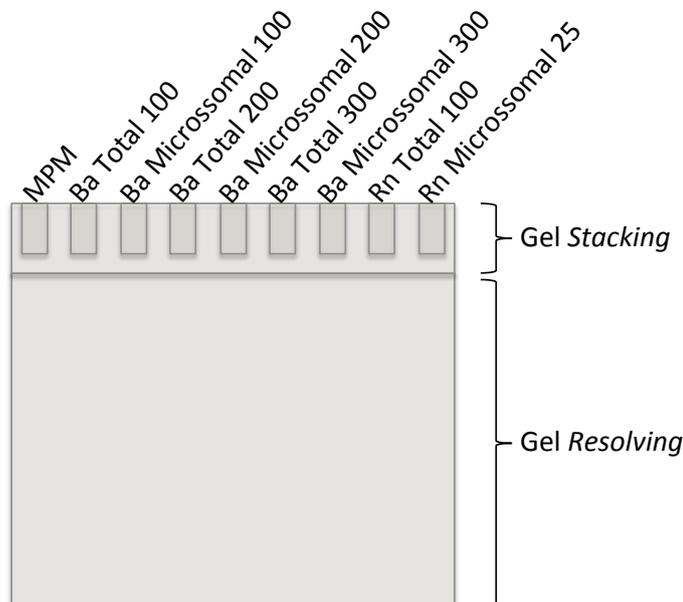
O gel foi depositado entre as lâminas de vidro do kit Mini-Protean da Bio-Rad, com cuidado para não formar bolhas. Foi deixado polimerizar por aproximadamente 50 minutos.

Após a polimerização do Gel *Resolving*, foi preparado o Gel *Stacking*, onde se encontram os poços para deposição das amostras. Após a preparação do Gel *Stacking* (7,5%: H<sub>2</sub>O 3,75 mL; *Buffer 2* 1,4 mL; acrilamida 40% 420 µL; APS 10% 55,5 µL; TEMED 3 µL; quantidades indicadas para a confecção de 2 géis de 1,5 mm de espessura no sistema Mini-Protean da Bio-Rad – *Buffer 2*: Tris 6 g; SDS 10% 4 mL; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100 mL e pH final 6,8.) o mesmo foi depositado entre as lâminas de vidro do Kit Mini-Protean sobre o Gel *Resolving*. Imediatamente após a deposição do Gel *Stacking*, os pentes para a formação dos poços de corrida foram inseridos.

Após a polimerização do Gel *Stacking* (aproximadamente 1 hora), os pentes foram retirados e as lâminas de vidro foram presas na cuba de corrida, com as lâminas de vidro menores voltadas para o centro da cuba. Foi adicionado tampão de corrida (Tris 3g; Glicina 14,4 g; SDS 10% 10 mL; água destilada q.s.p 1 L) entre os dois géis até que o nível ultrapassasse os jogos de lâminas, deixando os géis prontos para a deposição das amostras.

As amostras foram descongeladas e depositadas em microtubos em volume adequado à quantidade de proteínas para corrida. A cada microtubo foi acrescentado igual volume de Tampão de Laemmli e em seguida aquecidos a 100 °C durante 5 min sendo imediatamente depois inseridas no gel *Stacking* com uma seringa de Hamilton. Para o estudo da SERCA2a as amostras correspondentes às frações total de membranas e frações microssomais foram arranjadas de maneira intercalada no gel de poliacrilamida (Figura 10).

**Figura 10.** Arranjo das amostras e suas respectivas quantidades de proteína no gel de poliacrilamida em microgramas. MPM: marcador de peso molecular; Ba: *Brycon amazonicus*; Rn: *Ratus norvegicus*; Total: Fração total de membranas; Microssomal: Fração microssomal. Os números acima indicam a quantidade de proteínas em  $\mu\text{g}$  carregada em cada poço.



**Fonte:** RIVAROLI, L.

Para a análise da expressão do fosfolambano foram utilizadas apenas amostras relativas à fração microssomal do ventrículo do teleósteo, sendo realizadas corridas contendo 50 e 150  $\mu\text{g}$  de proteína. Para o estudo da expressão do fosfolambano foi utilizado volume correspondente a 25  $\mu\text{g}$  de proteína da fração microssomal do *R norvegicus*, como controle positivo.

Após inserir as amostras nos géis, o volume da cuba foi completado com o tampão de corrida. Os eletrodos foram ligados à fonte com voltagem constante de 80 volts por aproximadamente 3 horas e meia, em temperatura ambiente. A corrida foi finalizada quando as proteínas de baixo peso molecular das amostras avaliadas, após percorrerem o gel, caíram pela extremidade inferior no tampão da cuba.

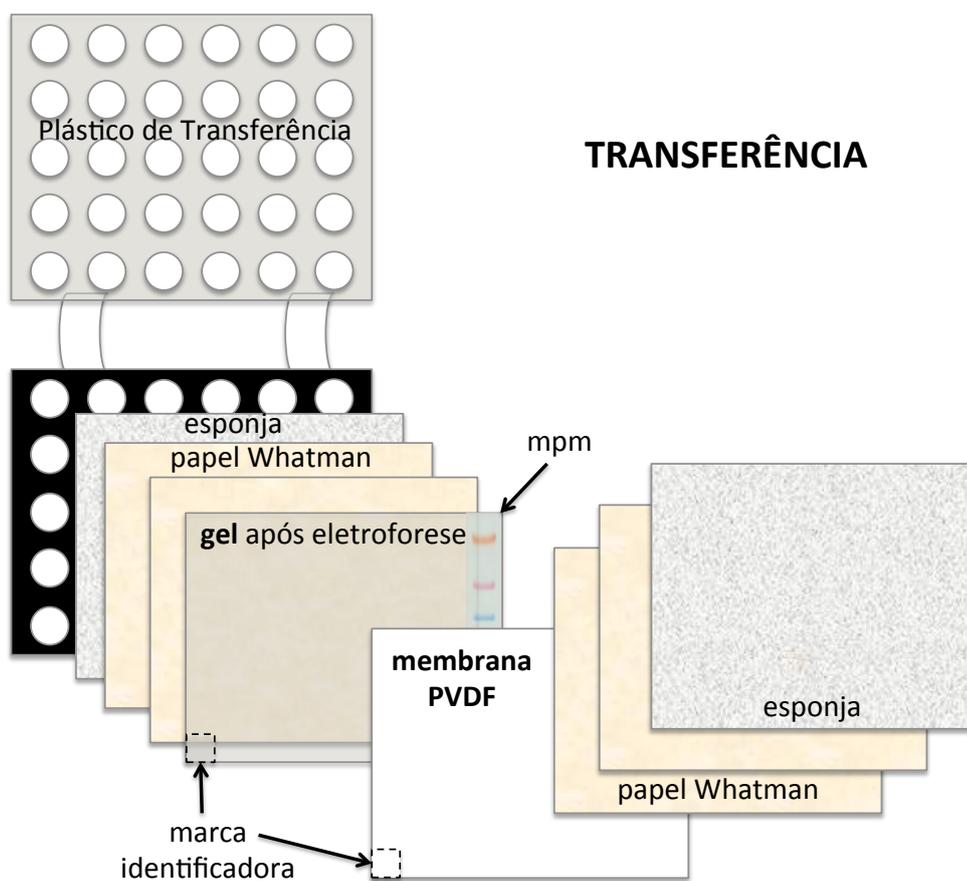
#### 3.6.4. TRANSFERÊNCIA

As proteínas separadas ao longo do gel pela eletroforese vertical foram transferidas por eletroforese para membranas de fluoreto de polividileno (PVDF) com dimensões de 5,5 x 8 cm. Antes da transferência, as membranas foram ativadas por 20 segundos em metanol, sendo posteriormente lavadas com água destilada,

permanecendo no tampão de transferência (Tris 3,08 g; Glicina 14,26 g; Metanol 20%; SDS 0,05%; água destilada q.s.p. 1 L) por mais 20 minutos.

Os géis foram retirados da cuba de eletroforese, sendo o gel *Stacking* removido com cuidado e descartado. O gel *Resolving* contendo as proteínas, foi inserido no sanduíche de transferência. Os géis e membranas de PVDF ficaram prensados entre esponjas e papéis de Whatman nos plásticos de transferência (Figura 11).

**Figura 11.** Esquema da posição do gel de poliacrilamida, após a eletroforese vertical, e da membrana de PVDF no sanduíche de transferência para a eletroforese.



Fonte: RIVAROLI, L.

Na cuba de eletroforese foram colocados os sanduíches de transferência juntamente com gelo e o tampão de transferência. O sistema foi levado a geladeira à 4 °C e ligado à fonte, com corrente constante de 230 mA durante aproximadamente 10 horas.

### 3.6.5. INCUBAÇÃO COM ANTICORPOS

Após a transferência as membranas foram colocadas em solução bloqueadora (leite desnatado 2g e 40 mL de Tampão de lavagem contendo NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; Tween-20 0,1%; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1 L) em temperatura ambiente e agitação constante por 90 minutos.

Para o estudo da expressão da SERCA2a, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-SERCA (Código sc-8095, da empresa Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.). O sc-8095 é um anticorpo policlonal de cabra, formado contra um peptídeo mapeado na extremidade N-terminal da proteína SERCA2a de origem humana. Para a incubação foi utilizada uma concentração 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> de anticorpo primário em solução bloqueadora. A incubação ocorreu sob agitação constante e refrigeração (4 °C) por aproximadamente 8 horas (*toda a noite*).

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem por 30 minutos, havendo renovação do tampão de lavagem a cada 10 minutos.

Após a lavagem as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário. Foi utilizado foi o anticorpo secundário anti-cabra IgG-HRP (Código sc-2354, da empresa Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.). O sc-2354 é procedente de camundongo, formado contra imunoglobulina G de cabra (anti-cabra) e conjugado com peroxidase de rabanete, foi utilizado em concentração de 0,2µg.mL<sup>-1</sup> de solução bloqueadora. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente por 2 horas.

Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem por 30 minutos, renovando o tampão de lavagem a cada 10 minutos. Após a lavagem as membranas estavam prontas para a detecção da SERCA2a por quimioluminescência.

Para o estudo da expressão do fosfolambano as membranas foram incubadas com o anticorpo purificado de camundongo anti-fosfolambano (clone A1) (Código #05-205, Upstate Chemicon, U.S.A.). O anti-fosfolambano (clone A1) é um anticorpo monoclonal de camundongo formado contra o retículo sarcoplasmático bovino. Para a incubação foi utilizada uma concentração de 0,15 µg.mL<sup>-1</sup>, sob agitação constante

e refrigeração (4 °C) por aproximadamente 8 horas (*toda noite*). Após a incubação do anticorpo primário, as membranas foram lavadas como descrito anteriormente.

O anticorpo secundário utilizado para a análise do fosfolambano foi de origem caprina, formado contra imunoglobulina G de camundongo conjugada com peroxidase de rabanete (Código #12-349, Upstate Chemicon, U.S.A.). Para a incubação foi utilizado em concentração de 0,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de solução bloqueadora. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente por 2 horas.

As membranas foram lavadas após a incubação com o anticorpo secundário como descrito anteriormente para em seguida detecção do fosfolambano por quimioluminescência.

### 3.6.6. REVELAÇÃO DAS MEMBRANAS

Para identificar as proteínas associadas aos anticorpos, foi utilizado o sistema ECL-Plus da GE Healthcare (Amersham Biosciences), que consiste em substrato lumigen PS-3 acridan o qual é convertido pela peroxidase conjugada no anticorpo secundário em um intermediário de ester de acridinium, este intermediário reage por sua vez com o peróxido em condições alcalinas e emite luminescência.

As membranas após a incubação com os anticorpos foram colocadas em um cassete para revelação autorradiográfica e sobre as membranas foi espalhado 1 mL da solução ECL-Plus. Após cinco minutos o excesso de ECL-Plus foi retirado.

As membranas tratadas com o ECL-Plus foram levadas no cassete ao laboratório de revelação onde ocorreu a exposição ao filme radiográfico (Hyperfilm, da GE Healthcare, Amersham Biosciences) para detectar a luminescência correspondente aos complexos antígeno-anticorpo formados no processo. A luminescência está diretamente relacionada com a quantidade de proteínas na membrana, o que significou diferentes tempos de exposição da membrana ao filme radiográfico para uma melhor obtenção da imagem.

Após a exposição às membranas, o filme foi colocado em revelador autorradiográfico por cinco minutos e em fixador por mais cinco minutos. Os filmes

foram lavados em água corrente para retirar os reagentes e após a secagem foram marcados e armazenados em arquivo através do uso de um *scanner*.

### 3.7. ANÁLISE MOLECULAR

Com o intuito de explicar os resultados obtidos com a técnica de *Western Blot* para as proteínas SERCA2a e fosfolambano, foram realizadas análises comparativas utilizando sequências de aminoácidos das proteínas estudadas em peixes e em organismos pertencentes à outras Ordens (mamíferos, aves, anfíbios) obtidas em bancos públicos tais como o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e o UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Os resultados dessas comparações foram obtidos após o alinhamento múltiplo das sequências da SERCA2a e do fosfolambano utilizando o programa Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994). O Clustal W é baseado na construção de dendogramas a partir de uma matriz com o score de similaridade do pareamento entre todas as sequências, o múltiplo alinhamento é alcançado com o alinhamento dos *clusters* criados na etapa anterior, em grupos cada vez mais amplos, seguindo a hierarquia da árvore construída (HIGGINS; SHARP, 1988 e LUND *et al.*, 2005 )

Análises subsequentes incluíram a realização de reconstruções filogenéticas baseadas nos modelos de *Neighbor-Joining* e Máxima Verossimilhança (NEI; KUMAR, 2000) e a busca por domínios e sítios ativos envolvidos com as funções de ambas as proteínas. O método *Neighbor-Joining*, considera as sequências como um todo e calcula a probabilidade de sua ocorrência (KUMAR, *et al.*, 2008), o método da máxima verossimilhança testa a probabilidade de ocorrência de mutações sobre uma sequência e reconstrói o possível ancestral em cada nó da árvore predita e através dos prováveis eventos mutacionais, prevê o comprimento dos ramos (LESK, 2008).

#### 4. RESULTADOS

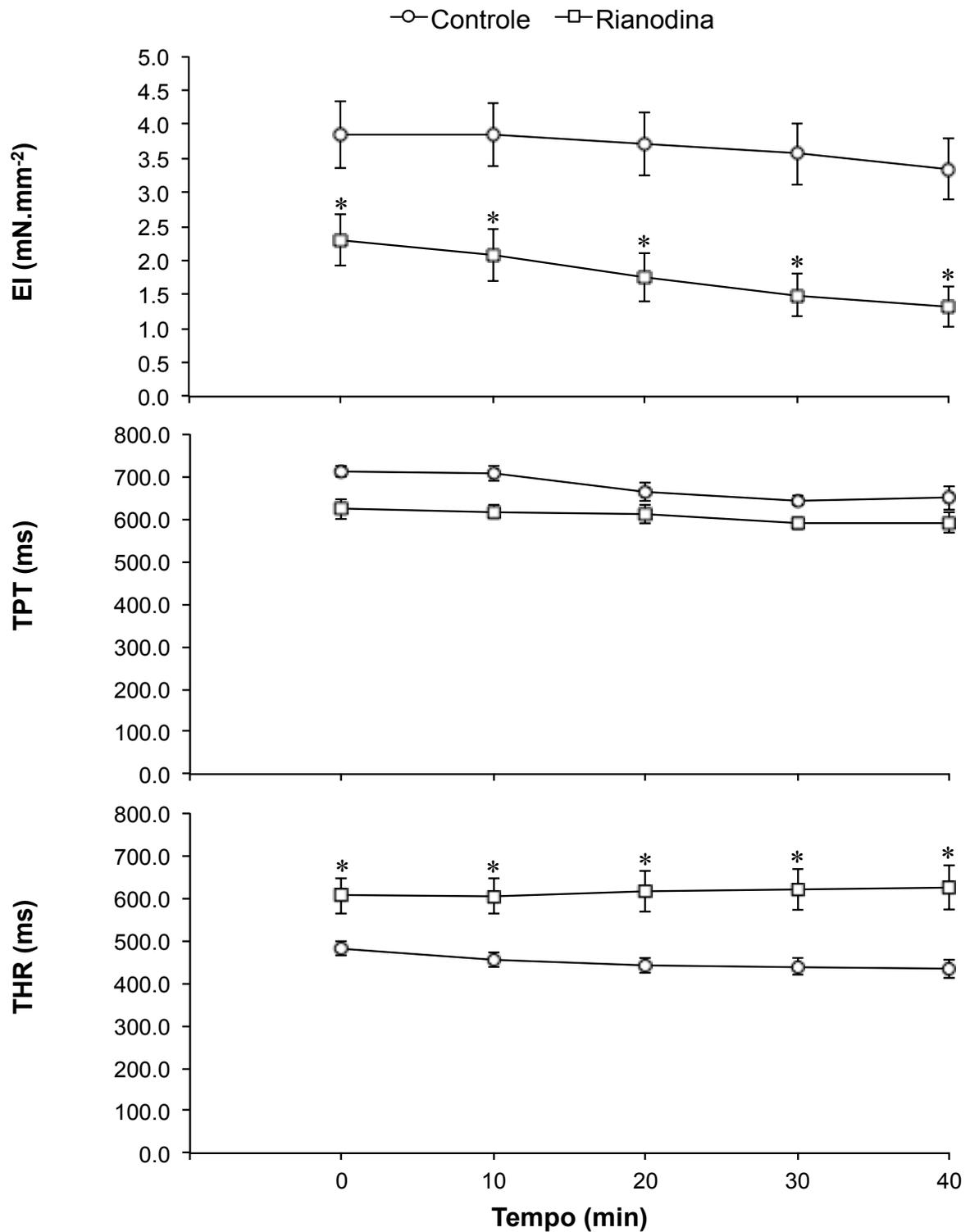
A exposição das preparações ao tempo experimental não demonstraram deterioração da capacidade de desenvolvimento de tensão, como pode ser observado pela curva do Estresse Isométrico (EI, painel superior da Figura 8), mantendo uma média de  $3,66 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  de tensão ao longo de 40 minutos. Os parâmetros dependentes do tempo, o TPT e o THR também não mostraram alteração significativa ao longo do período experimental de 40 minutos, mantendo média de 675,01 e 450,14 ms respectivamente (painéis intermediário e inferior da Figura 12).

Assim como no grupo controle, não foi observada alteração do EI ao longo dos 40 minutos de experimentação, sendo que a média de tensão ao longo do experimento foi  $1,79 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ , em todos os tempos experimentais a tensão foi significativamente inferior ao grupo controle (Figura 12). Os valores do TPT não apresentaram diferenças para os valores observados no grupo controle e mantiveram-se estáveis com média de 607,04 ms. Os valores de THR também mantiveram-se estáveis durante os 40 minutos de procedimento experimental, no entanto foram significativamente superiores aos valores do grupo controle em todos os pontos medidos, apresentando uma média de 613,83 ms.

A partir dos valores de EI, TPT e THR foram calculados as Taxas de Contração (TC) e as Taxas Iniciais de Relaxamento (TIR, Figura 13). No grupo controle tanto TC e TIR demonstraram estabilidade ao longo do tempo de exposição experimental, não sendo identificadas diferenças significativas, apresentando valores médios de 5,48 e  $4,11 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

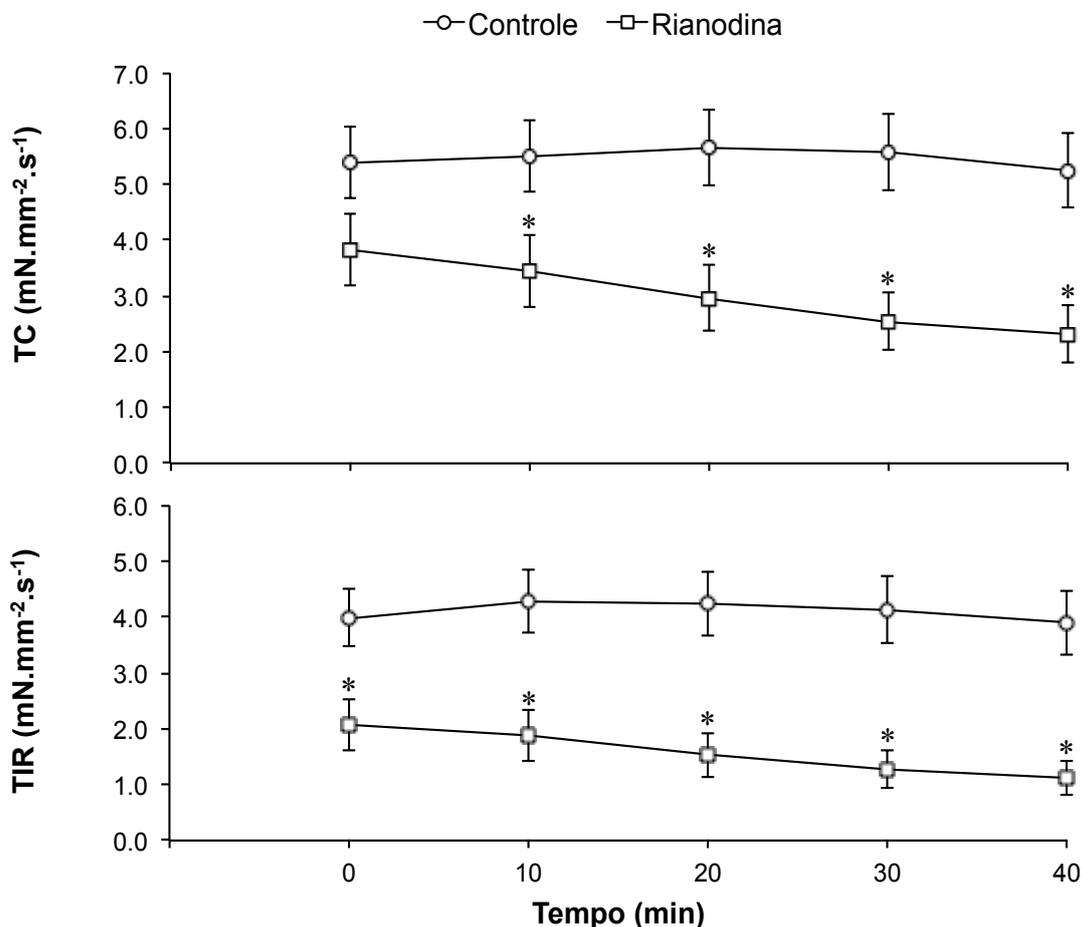
Os valores de TC e TIR para o grupo exposto à Rianodina não demonstraram alterações ao longo do procedimento experimental, apresentando médias de 3,02 e  $1,57 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectivamente. Ambas as taxas apresentaram redução significativa em relação aos valores do grupo Controle, excetuando-se a TC no período experimental inicial (0 minuto), onde não foram identificadas diferenças significativas (Figura 13).

**Figura 12.** Efeito do tempo de exposição experimental nas condições controle e em exposição à 10  $\mu\text{M}$  de Rianodina. Os valores do Estresse Isométrico (EI) estão representados no painel superior e os parâmetros dependentes do tempo, TPT e THR, respectivamente nos painéis intermediário e inferior. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).



Fonte: RIVAROLI, L.

**Figura 13.** Efeito do tempo de exposição experimental nas condições controle e em exposição à 10  $\mu\text{M}$  de Rianodina. Os valores de Taxa de Contração (TC) estão representados no painel superior e as Taxas Iniciais de Relaxamento (TIR) no painel inferior. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).



Fonte: RIVAROLI, L.

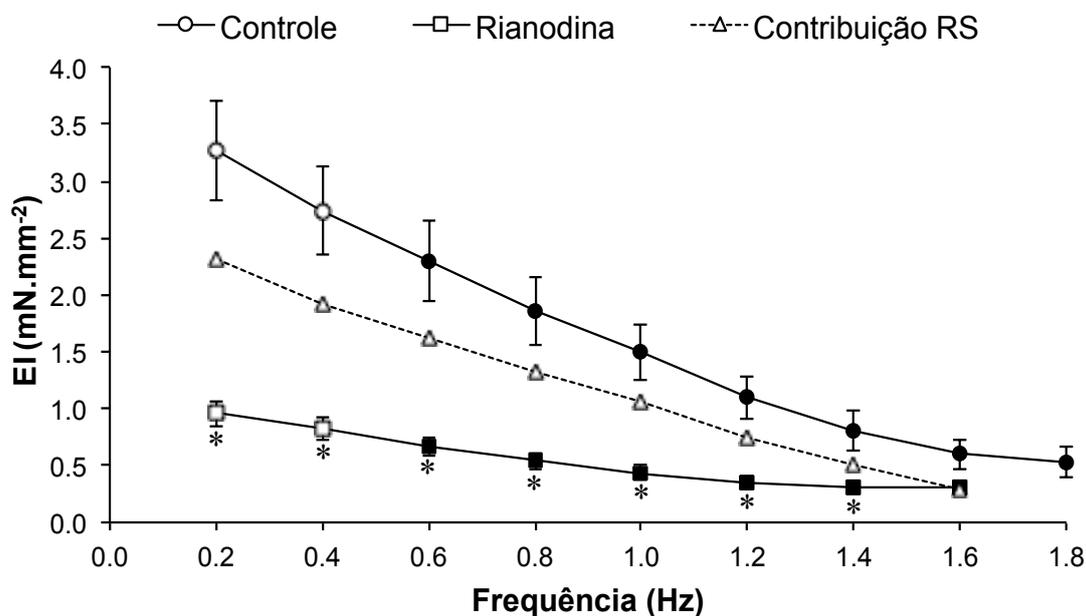
O ventrículo do *B. amazonicus* apresenta um comportamento de efeito escada negativo com redução do desenvolvimento de tensão como aumento da frequência de estimulação, apresentando valores iniciais de tensão de 3,26  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  com reduções significativas do EI a partir da frequência de 0,6 Hz (2,29  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) chegando a 0,53  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  na frequência máxima de estimulação de 1,8 Hz (Figura 14).

O grupo tratado com Rianodina também apresentou o mesmo comportamento de efeito escada negativo (Figura 14), no entanto, como os valores foram significativamente inferiores aos do grupo controle (exceto a 1,6 Hz), a inclinação observada foi mais suave, com valores de EI iniciais de 0,96  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ , com

reduções significativas a partir de 0,6 Hz (0,67 mN.mm<sup>-2</sup>), chegando a valores mínimos de 0,31 mN.mm<sup>-2</sup> a 1,6 Hz.

Uma aproximação matemática para estimar a contribuição do RS do miocárdio ventricular do *B. amazonicus* foi realizada com a subtração dos valores de EI obtidos no grupo exposto a Rianodina dos valores obtidos para o grupo Controle (Figura 14).

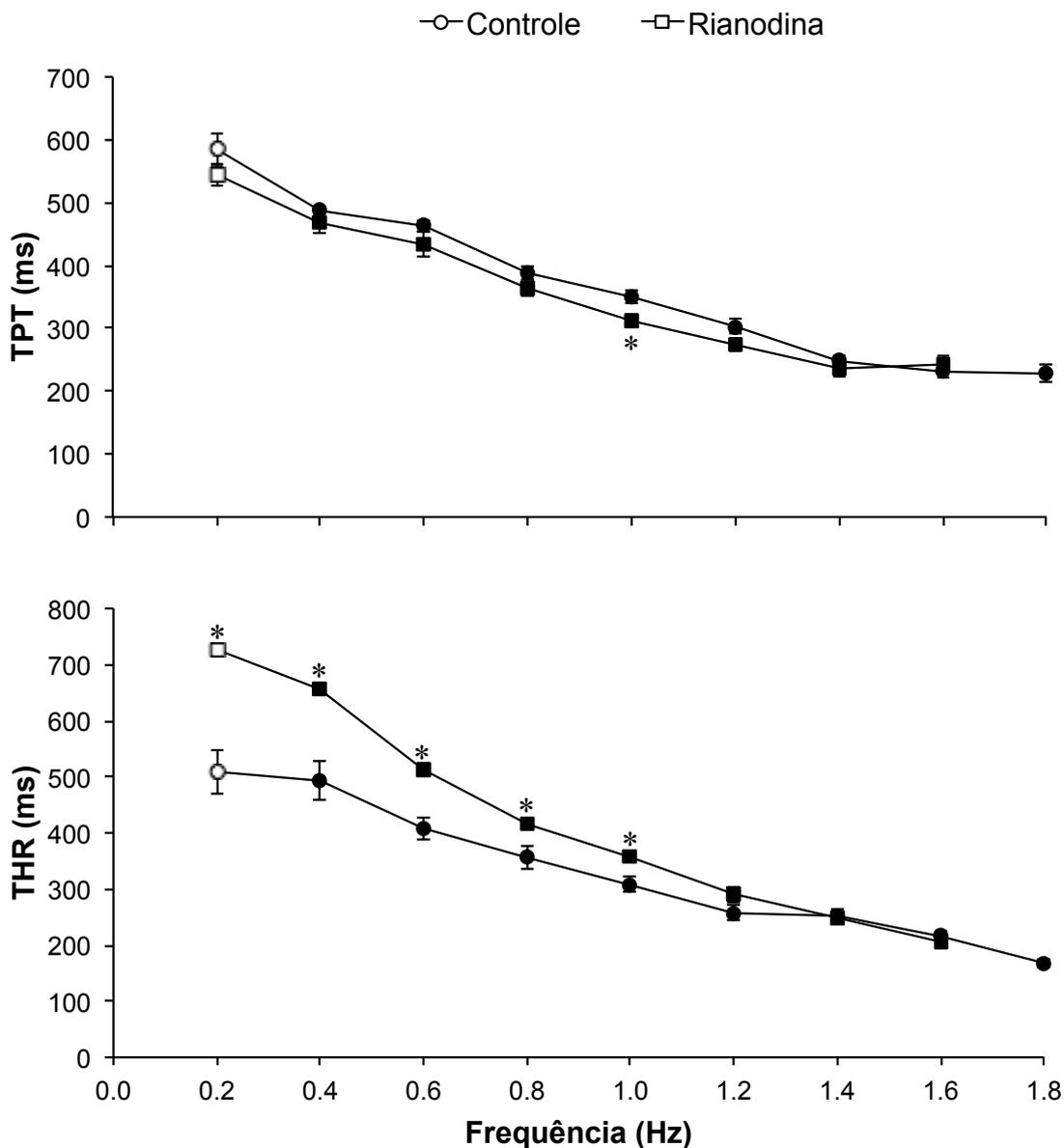
**Figura 14.** Efeito da elevação da frequência de estimulação no EI dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10 µM de rianodina. Valores Médios ± E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). A subtração dos valores médios do grupo Rianodina dos valores médios do grupo Controle, em cada frequência testada, gerou a curva "Contribuição RS".



Fonte: RIVAROLI, L.

Assim como o EI, o TPT também foi reduzido ao longo dos incrementos de frequência de estimulação (Figura 15 – painel superior), apresentando valores iniciais de 585 ms, e redução significativa a partir de 0,4 Hz (487 ms), chegando a valores mínimos de 228 ms a 1,8 Hz de estimulação. O grupo exposto a Rianodina apresentou valores semelhantes de TPT, com redução dos valores de acordo com o aumento da frequência de estimulação, não houve diferença significativa em nenhuma frequência estimulatória, com exceção da frequência de 1,0 Hz, onde o TPT do grupo Rianodina foi ligeiramente inferior ao do grupo controle (350 e 312 ms, respectivamente). O TPT do grupo controle apresentou valores iniciais de 544 ms, atingindo valores mínimos de 244 ms a 1,6 Hz.

**Figura 15.** Efeito da elevação da frequência de estimulação no TPT e THR dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu$ M de Rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).



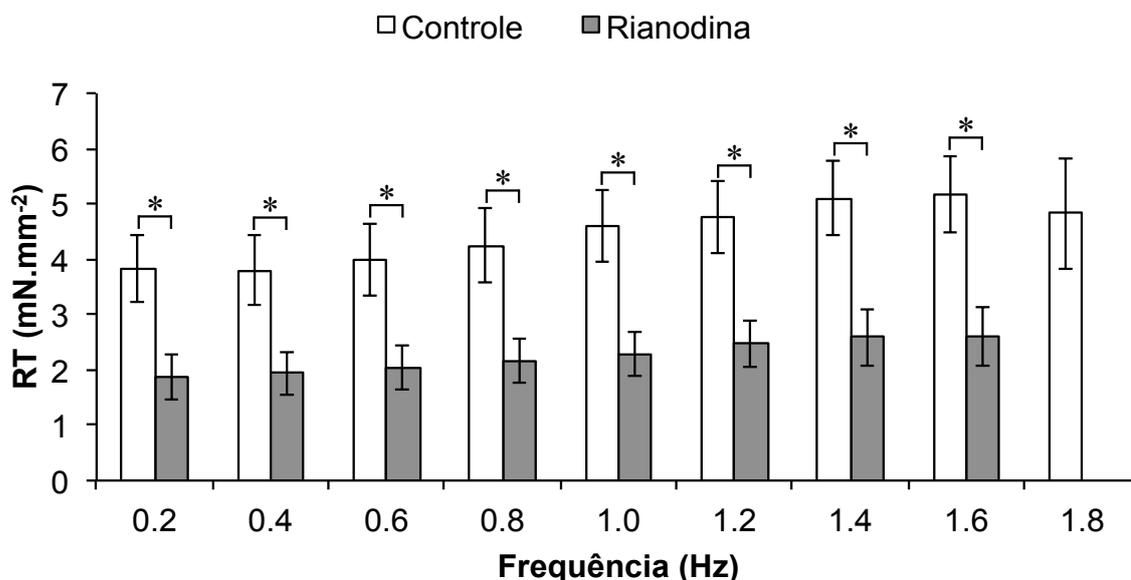
Fonte: RIVAROLI, L.

O THR apresentou comportamento semelhante ao do TPT em relação a elevação da frequência de estimulação, ocorrendo diminuição de seus valores ao longo do experimento. No grupo controle o THR apresentou valores iniciais de 509 ms, com reduções significativas a 0,4 Hz (493 ms), chegando aos valores mínimos (168 ms) na frequência máxima de estimulação. Apesar do comportamento de redução do THR, o grupo exposto à rianodina apresentou valores significativamente superiores aos valores do grupo controle no intervalo experimental compreendido

entre as frequências estimulatórias 0,2 e 1,0 Hz. Os valores iniciais do THR para o grupo foram de 735 ms, com reduções significativas (657 ms) a 0,4 Hz e valores mínimos na frequência máxima de estimulação, 204 ms a 1,6 Hz.

Apesar da tendência ao aumento na tensão de repouso, a elevação na frequência de estimulação não provocou alterações significativas na linha de base ao longo do procedimento experimental, tanto no grupo controle quanto no exposto à rianodina (Figura 16).

**Figura 16.** Tensão de Repouso (RT) durante elevações da frequência de estimulação nas preparações do grupo controle e do grupo exposto à rianodina (10  $\mu$ M). Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).



Fonte: RIVAROLI, L.

No grupo tratado com rianodina, foi observada uma RT significativamente inferior a do grupo controle em todas as frequências de estimulação (Tabela 2).

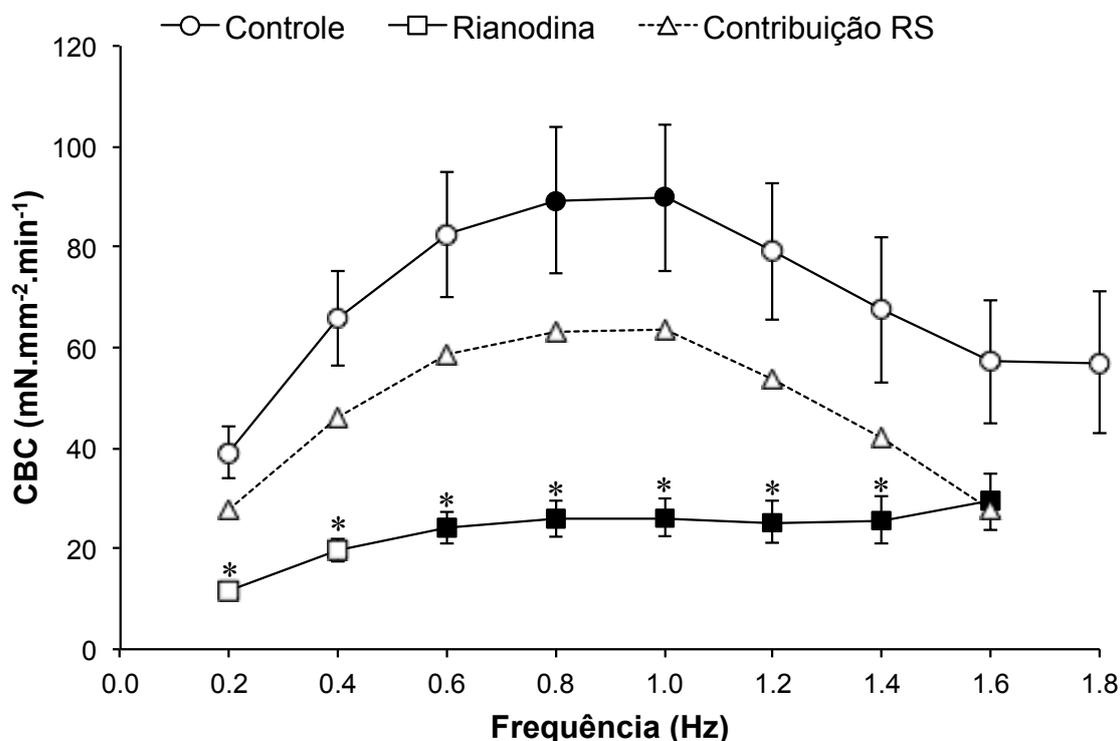
**Tabela 2.** Tensão de repouso (RT) durante elevações da frequência de estimulação nas preparações do grupo controle e do grupo exposto à rianodina (10  $\mu$ M). Valores Médios  $\pm$  E.P.M.

Frequência de Estimulação (Hz)	Tensão de Repouso (RT – mN.mm <sup>-2</sup> )	
	Controle	Rianodina
0.2	3.8 $\pm$ 0.61	1.8 $\pm$ 0.41
0.4	3.8 $\pm$ 0.63	1.9 $\pm$ 0.39
0.6	4.0 $\pm$ 0.66	2.0 $\pm$ 0.39
0.8	4.2 $\pm$ 0.67	2.1 $\pm$ 0.40
1.0	4.6 $\pm$ 0.65	2.3 $\pm$ 0.40
1.2	4.7 $\pm$ 0.65	2.4 $\pm$ 0.41
1.4	5.1 $\pm$ 0.68	2.6 $\pm$ 0.52
1.6	5.2 $\pm$ 0.69	2.6 $\pm$ 0.55
1.8	4.8 $\pm$ 1.00	---

Fonte: RIVAROLI, L.

No grupo controle a faixa de frequência em que a CBC é mais elevada, está entre 0,8 e 1,0 Hz (respectivamente  $89,17 \pm 14,6$  e  $89,83 \pm 14,7$  mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>, Figura 17). Nas frequência anteriores e posteriores a esta faixa não houve diferença significativa para a os valores de CBC iniciais. Com exceção a última frequência de estimulação, o grupo exposto a rianodina apresentou valores de CBC significativamente menores que os valores do grupo controle, quanto ao comportamento da curva da CBC, ocorreu uma elevação dos valores dependente da frequência, com diferenças significativas em relação aos valores iniciais ( $11,5 \pm 1,4$  mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>) a partir da frequência de 0,6 Hz ( $24,1 \pm 3,1$  mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>), chegando aos valores máximos de  $29,4 \pm 5,7$  mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup> à 1,6 Hz.

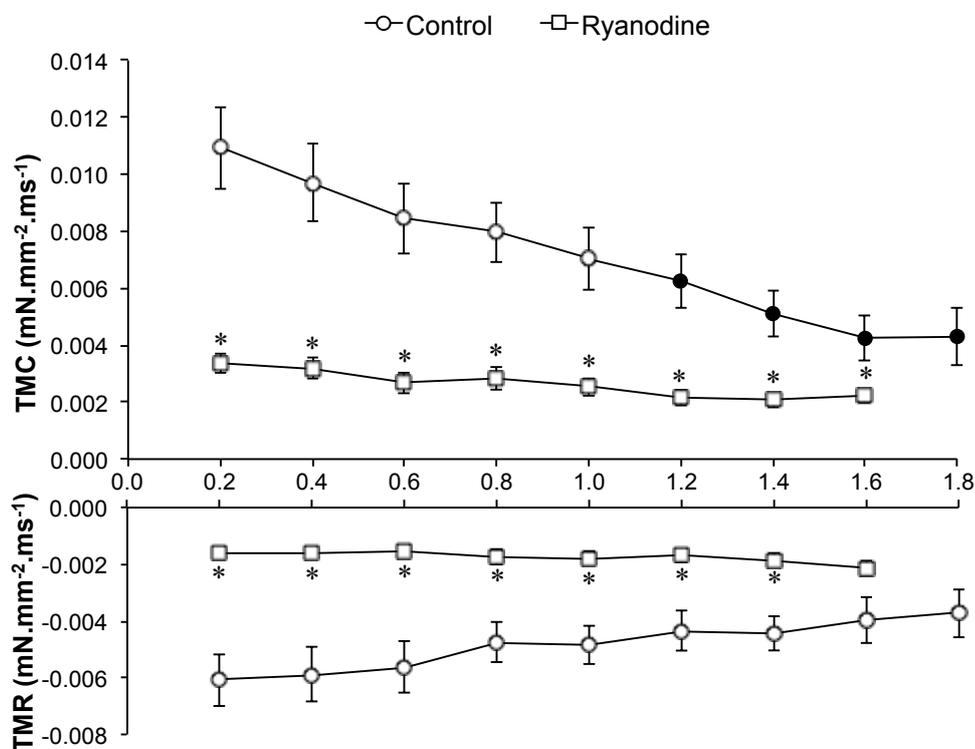
**Figura 17.** Efeito da elevação da frequência de estimulação na CBC dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu\text{M}$  de rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). A subtração dos valores médios do grupo Rianodina do valores médios do grupo Controle, em cada frequência testada, gerou a curva "Contribuição RS".



Fonte: RIVAROLI, L.

A TMC do grupo controle apresentou valores superiores aos do grupo tratado com rianodina em todas as frequências de estimulação testadas (Figura 18). Os grupos controle e tratados com rianodina apresentaram comportamentos distintos com a elevação da frequência de estimulação, sendo que o primeiro grupo apresentou uma redução progressiva da TMC, partindo de  $0,011 \pm 0,001 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{ms}^{-1}$  na frequência inicial, com redução significativa na frequência de 1,2 Hz ( $0,006 \pm 0,001 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{ms}^{-1}$ ) até atingirem os menores valores de  $0,004 \pm 0,001 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{ms}^{-1}$  à 1,8 Hz. O grupo tratado com rianodina, por outro lado, não apresentou redução da TMC ao longo das elevações de frequência apresentando valores iniciais (0,2 Hz) de  $0,0030 \pm 0,0003 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{ms}^{-1}$  e  $0,0020 \pm 0,0003 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{ms}^{-1}$  na frequência de estimulação máxima (1,6 Hz).

**Figura 18.** Efeito da elevação da frequência de estimulação na TMC (painel superior) e TMR (painel inferior) dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu$ M de Rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ )



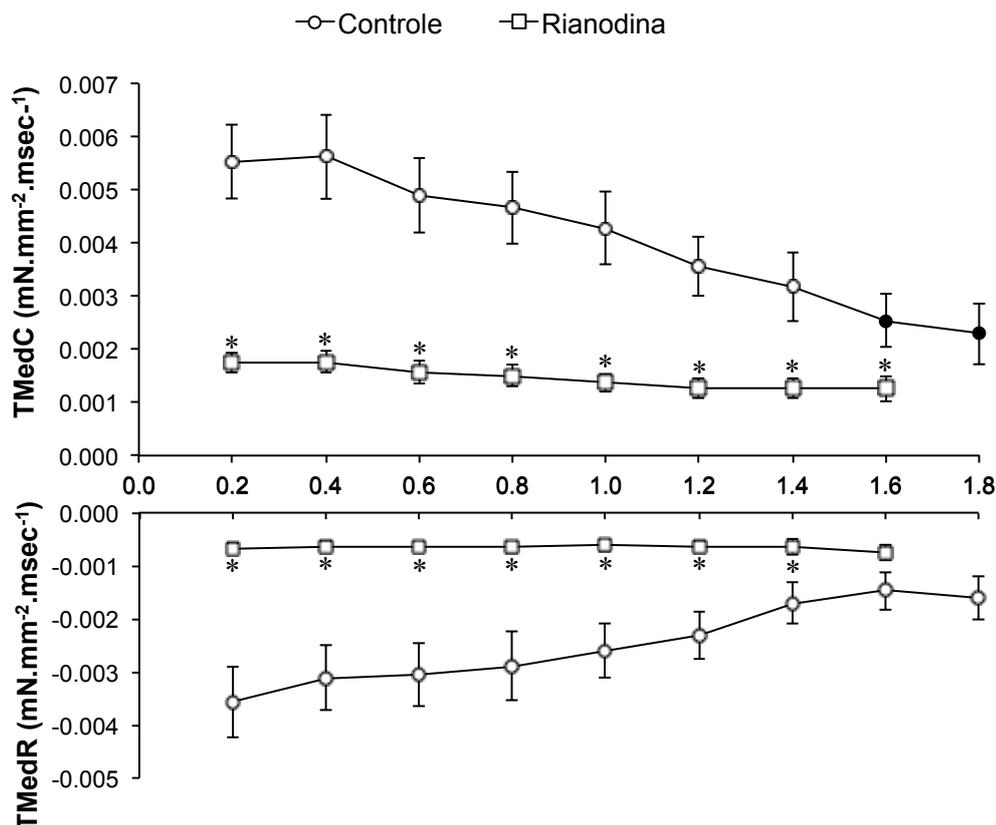
Fonte: RIVAROLI, L.

Apesar da tendência a redução da TMC no grupo controle, não foram identificadas diferenças significativas na TMC entre os valores iniciais e as frequências testadas. Os valores de TMR do grupo controle foram significativamente superiores aos do grupo exposto a rianodina na faixa entre 0,2 Hz e 1,4 Hz ( $0,0060 \pm 0,0010$  e  $0,0016 \pm 0,0002$  mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup> a 0,2 Hz e  $0,0040 \pm 0,0010$  e  $0,0018 \pm 0,0002$  mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup> a 1,4 Hz, respectivamente para os grupos controle e exposto a rianodina).

A TMedC do grupo controle apresentou redução significativa nas frequências máximas de estimulação ( $0,0025 \pm 0,0005$  e  $0,0023 \pm 0,0006$  mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup>, respectivamente a 1,6 e 1,8 Hz, Figura 19). O grupo exposto a rianodina apresentou valores de TMedC estáveis, com  $0,0017 \pm 0,0002$  mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup> na frequência inicial e  $0,0013 \pm 0,0002$  mN.mm<sup>-2</sup>.ms<sup>-1</sup> na frequência máxima alcançada, não havendo diferenças significativas dos valores iniciais. Em relação ao grupo controle, foi

identificado uma redução significativa em todas as frequências de estimulação testadas.

**Figura 19.** Efeito da elevação da frequência de estimulação na TMedC (painel superior) e TMedR (painel inferior) dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu\text{M}$  de rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).



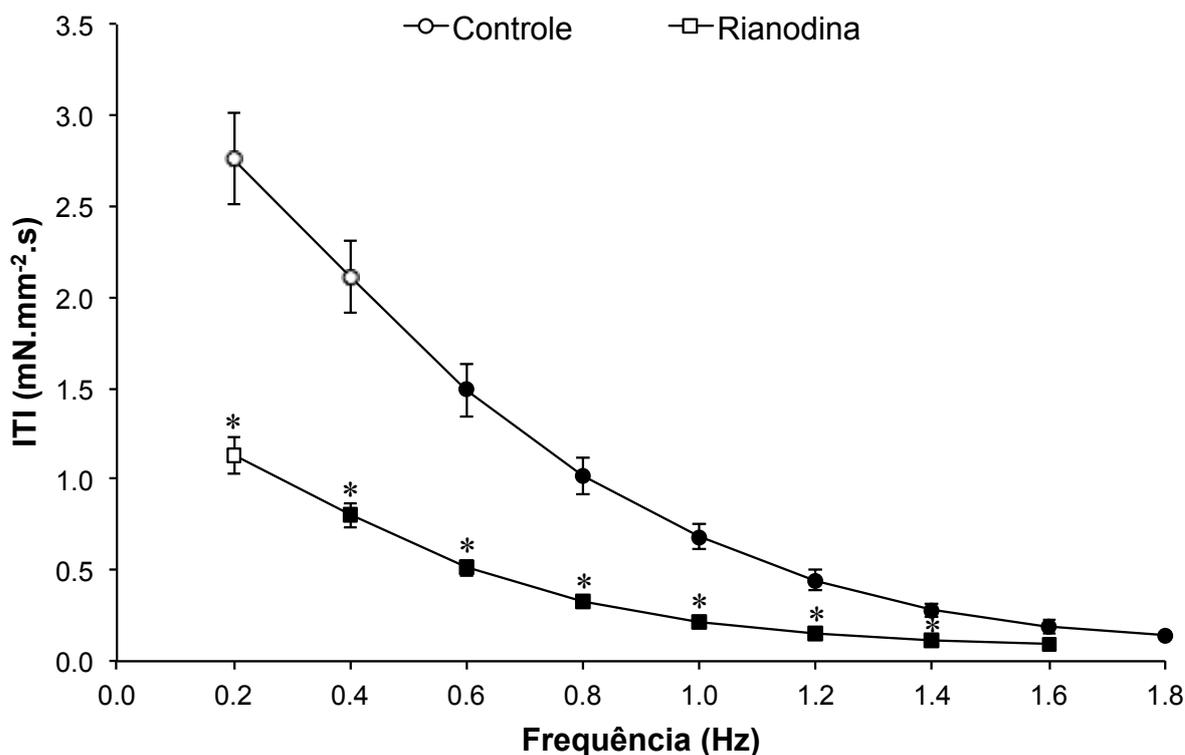
Fonte: RIVAROLI, L.

Apesar da tendência à redução, os valores de TMedR do grupo controle não apresentaram alterações significativas com a elevação da frequência, sendo observados valores de  $0,0036 \pm 0,0007$  e  $0,0016 \pm 0,0004$   $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{ms}^{-1}$  a 0,2 e 1,8 Hz, respectivamente. Assim como observado para a TMR, com a elevação da frequência de estimulação, a TMedR do grupo exposto a rianodina apresentou valores estáveis, partindo de  $0,0007 \pm 0,0001$   $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{ms}^{-1}$  a 0,2 Hz para  $0,0008 \pm 0,0001$   $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{ms}^{-1}$  a 1,6 Hz.

Pode-se observar que a ITI ( $\text{mNmm}^{-2} \cdot \text{s}$ ) apresenta uma redução dependente da frequência, assim como foi observado para o EI, em ambos os grupos experimentais (Figura 20). O grupo controle apresentou valores iniciais de  $2,8 \pm 0,3$

mNmm<sup>-2</sup>.s, com redução significativa a partir da frequência de 0,6 Hz ( $1,5 \pm 0,2$  mNmm<sup>-2</sup>.s), chegando aos menores valores a 1,8 Hz ( $0,1 \pm 0,04$  mNmm<sup>-2</sup>.s).

**Figura 20.** Efeito da elevação da frequência de estimulação na ITI de uma única onda de contração, nos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10 µM de Rianodina. Valores Médios ± E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).



Fonte: RIVAROLI, L.

As preparações expostas a rianodina apresentaram valores de ITI significativamente inferiores aos observados no grupo controle, com exceção da maior frequência de estimulação alcançada (1,6 Hz). O grupo exposto a rianodina apresentou uma redução da ITI dependente da frequência reduzindo significativamente os valores iniciais ( $1,13 \pm 0,13$  mNmm<sup>-2</sup>.s a 0,2 Hz) a partir de 0,4 Hz ( $0,8 \pm 0,1$  mNmm<sup>-2</sup>.s), atingindo os menores valores a 1,6 Hz ( $0,1 \pm 0,02$  mNmm<sup>-2</sup>.s).

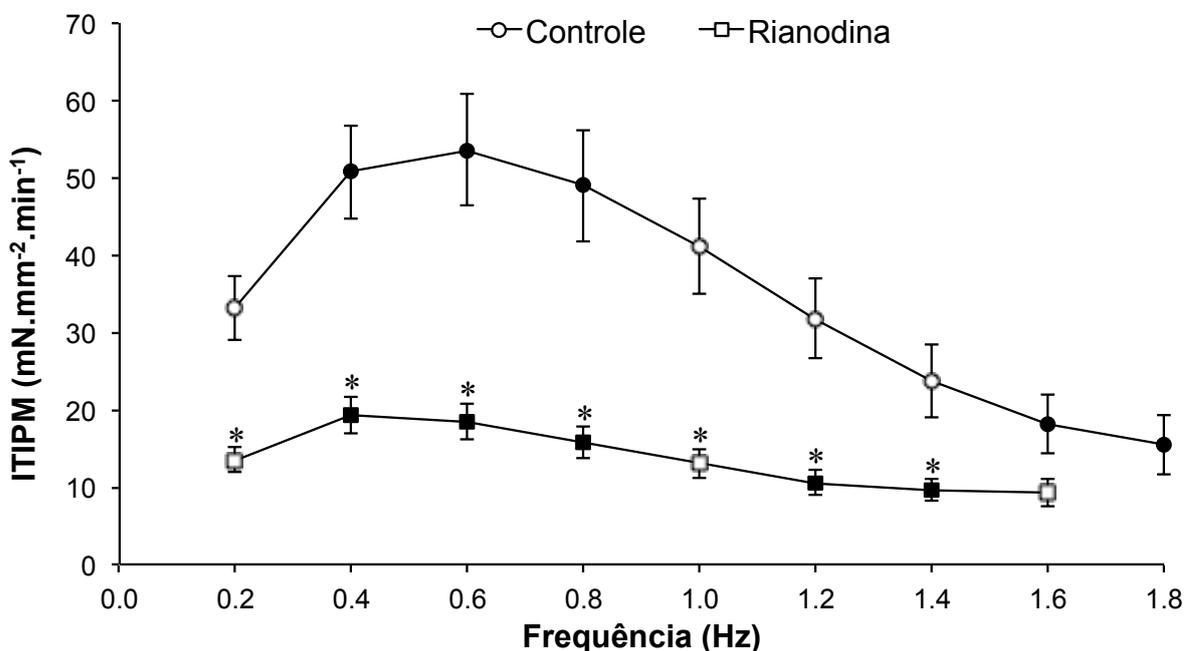
Para comparações entre a ITI e a CBC, a foi calculado o somatório da área sob as curvas de contração no intervalo de 1 minuto (ITIPM, mNmm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>, Figura 21). O grupo controle apresentou valores de ITIPM iniciais de  $33 \pm 4,1$  mNmm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>, sendo que à 0,4; 0,6 e 0,8 Hz houve uma elevação significativa da ITIPM ( $50,8 \pm 6,1$ ;  $53,6 \pm 6,1$  e  $48,9 \pm 7,2$  mNmm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>, respectivamente). Na faixa de frequência

entre 1,0 e 1,4 Hz não houve diferença em relação aos valores iniciais e nas maiores frequências houve uma redução significativa da ITIPM, chegando a  $15,5 \pm 3,9$   $\text{mNmm}^{-2}.\text{min}^{-1}$  na frequência de 1,8 Hz.

A curva da ITIPM do grupo tratado com rianodina apresentou comportamento semelhante ao do grupo controle, com elevação significativa à 0,4; 0,6 e 0,8 Hz ( $19,2 \pm 2,4$ ;  $18,5 \pm 2,3$  e  $15,8 \pm 2,1$   $\text{mNmm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ , respectivamente). Não houve diferença para os valores iniciais a 1,0 Hz ( $13,0 \pm 1,8$   $\text{mNmm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ ) e houve redução significativa nas frequências superiores a essa, excetuando a frequência de 1.6 Hz ( $9.2 \pm 1.8$   $\text{mNmm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ ).

O grupo controle apresentou ITIPM superior ao do grupo tratado com rianodina em todas as frequências de estimulação testadas, havendo diferenças significativas na faixa compreendida entre 0,2 e 1,4 Hz.

**Figura 21.** Efeito da elevação da frequência de estimulação na ITIPM dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).

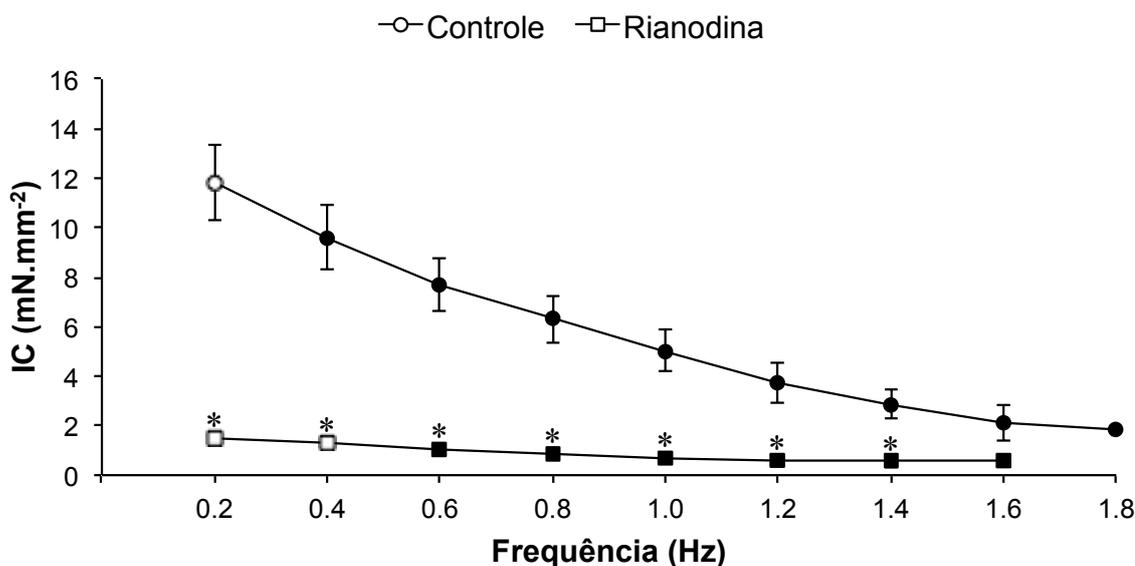


Fonte: RIVAROLI, L.

O IC do grupo controle apresentou redução significativa a partir do primeiro incremento de frequência, partindo de  $11,8 \pm 1,6$   $\text{mN}.\text{mm}^{-2}$  na frequência inicial para  $9,6 \pm 1,5$   $\text{mN}.\text{mm}^{-2}$  a 0,4 Hz chegando a  $1,8 \pm 0,7$   $\text{mN}.\text{mm}^{-2}$  na frequência máxima alcançada (Figura 22). O grupo tratado com rianodina apresentou valores de IC

significativamente inferiores aos do grupo controle, exceto a 1,6 Hz, onde os valores mínimos foram registrados ( $0,6 \pm 0,2 \text{ mN.mm}^{-2}$ ). O IC do grupo tratado com rianodina, de  $1,5 \pm 0,3 \text{ mN.mm}^{-2}$  nas frequências iniciais, reduziu-se significativamente a partir 0,6 Hz ( $1,0 \pm 0,2 \text{ mN.mm}^{-2}$ ).

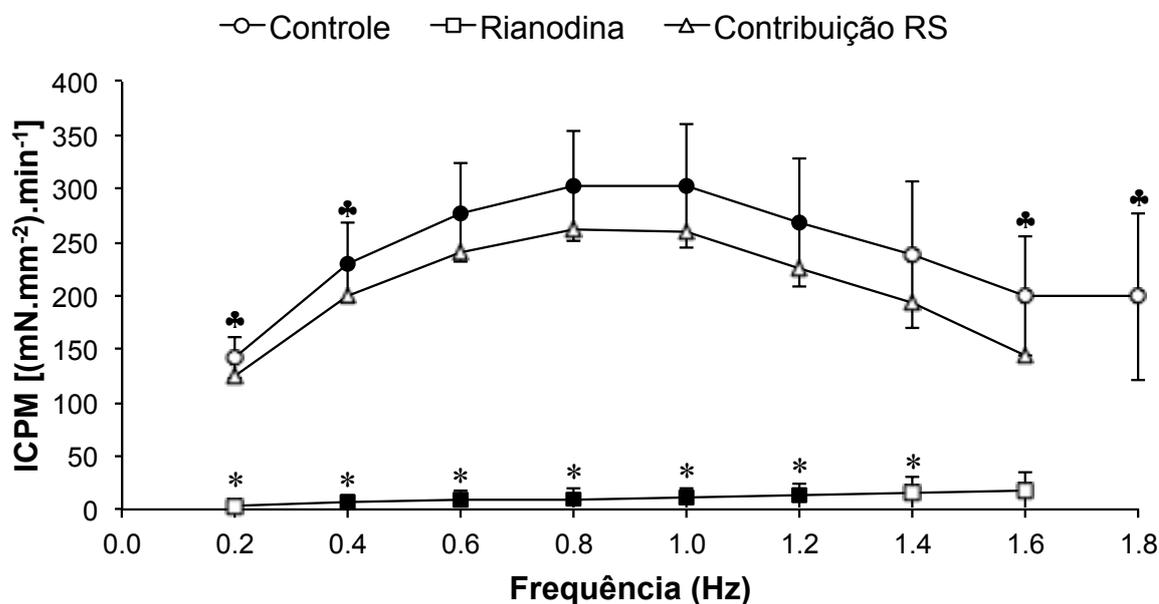
**Figura 22.** Efeito da elevação da frequência de estimulação no IC dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à  $10 \mu\text{M}$  de rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais e o asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).



Fonte: RIVAROLI, L.

O grupo controle apresentou valores de ICPM (Figura 23) significativamente superiores aos iniciais na faixa que compreende as frequências de estimulação de 0,4 e 1,2 Hz ( $230,5 \pm 36,8$  e  $268,1 \pm 59,6 \text{ mN.mm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ , a 0,4 e 1,2 Hz, respectivamente). Nas frequências de estimulação mais elevadas (1,4; 1,6 e 1,8 Hz) não houveram diferenças significativas em relação aos valores iniciais. Quando considerado como referência a frequência de 0,8 Hz, que apresenta os maiores valores de ICPM ( $302,2 \pm 51,2 \text{ mN.mm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ ), estes são significativamente superiores aos valores apresentados de 0,2; 0,4; 1,6 e 1,8 Hz ( $142,1 \pm 19,4$ ;  $230,5 \pm 36,8$ ;  $199,2 \pm 55,9$  e  $199,0 \pm 78,0 \text{ mN.mm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ , respectivamente).

**Figura 23.** Efeito da elevação da frequência de estimulação no ICPM dos grupos experimentais nas condições controle e em exposição à 10  $\mu$ M de rianodina. Valores Médios  $\pm$  E.P.M.. Símbolos fechados representam diferenças significativas em relação aos valores iniciais, os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle e os símbolos de *paus* representam diferenças significativas para os valores de ICPM a 0.8 Hz ( $P < 0,05$ ).



Fonte: RIVAROLI, L.

Para o estudo da expressão proteica da SERCA2a, a análise dos homogenatos dos ventrículos cardíacos revelou uma quantidade total de proteínas superior na preparação que utilizou a fração celular total de membranas tanto nos homogenatos preparados para *B. amazonicus*, como para aqueles preparados para *R. norvegicus* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Quantidade de proteínas totais nos homogenatos obtidos para estudo da expressão proteica da SERCA2a, referentes às frações de membranas total e microssomal do tecido ventricular do teleosteo *B. amazonicus* e do roedor *R. norvegicus*.

Espécie	Fração de membranas	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )
<i>B. amazonicus</i>	Total	34,1
	Microssomal	19,2
<i>R. norvegicus</i>	Total	65,8
	Microssomal	1,33

Fonte: RIVAROLI, L.

A partir da estimativa da quantidade de proteínas totais dos homogenatos do tecido ventricular foi calculada a quantidade de amostra necessária para a realização dos testes com o *imunoblotting*. Para a expressão da SERCA2a, foram testados 100, 200 e 300 µg de proteínas do ventrículo do teleósteo para o processo (eletroforese e imunoblotting) tanto para a fração total de membranas quanto para a microsomal (Tabela 4). Para o ventrículo esquerdo de rato foi utilizado um volume correspondente a 25 µg de proteínas, valor já estabelecido em protocolos do Laboratório de Fisiologia Vascular e suficiente para a análise da expressão de diversas proteínas em ventrículo esquerdo de ratos Wistar.

**Tabela 4.** Volume das amostras para a quantidade de proteína total desejada no processo de eletroforese, segundo a concentração de proteínas nos homogenatos do tecido ventricular de *B. amazonicus* e *R. norvegicus*, nas frações de membrana total e microsomal obtidos no presente estudo. Valores para homogenatos obtidos para estudo da expressão da SERCA2a.

Espécie	Fração de membranas	Volume (µL)			
		25 µg	100 µg	200 µg	300 µg
<i>B. amazonicus</i>	Total	0,73	2,93	5,87	8,80
	Microsomal	1,30	5,21	10,42	15,63
<i>R. norvegicus</i>	Total	0,38	1,52	---	---
	Microsomal	18,80	---	---	---

Fonte: RIVAROLI, L.

O estudo da expressão protéica do fosfolambano foi realizada posteriormente ao da expressão protéica da SERCA2a, foram preparados apenas homogenatos contendo a fração microsomal e, assim como nas preparações para a SERCA2a, as preparações do ventrículo do teleósteo mostraram maior concentração total de proteínas do que as preparações para o ventrículo esquerdo de *R. norvegicus* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Quantidade de proteínas totais nos homogenatos obtidos para estudo da expressão do fosfolambano, referentes a fração microssomal do tecido ventricular do teleósteo *B. amazonicus* e do roedor *R. norvegicus*.

Fração Microssomal	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )
<i>B. amazonicus</i>	11,1
<i>R. norvegicus</i>	1,7

Fonte: RIVAROLI, L.

Mediante os resultados obtidos pelo *imunoblotting* para a SERCA2a, foram utilizados no estudo da expressão do fosfolambano, na eletroforese e *imunoblotting*, amostras com volumes correspondentes às quantidades de 50 e 150µg de proteína para o ventrículo de *B. amazonicus* (Tabela 6). Para o ventrículo do rato Wistar foi utilizada amostra com volume correspondente a 25µg, como no estudo da expressão da SERCA2a.

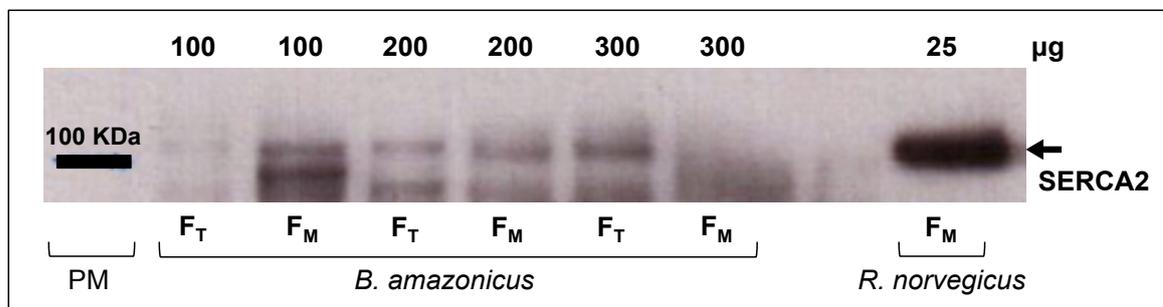
**Tabela 6.** Volume das amostras para a quantidade de proteína total desejada no processo de eletroforese, segundo a concentração de proteínas nos homogenatos do tecido ventricular de *B. amazonicus* e *R. norvegicus*, nas fração microssomal obtidos no presente estudo. Valores para homogenatos obtidos para estudo da expressão da fosfolambano.

Fração microssomal	Volume (µL)		
	25 µg	50 µg	150 µg
<i>B. amazonicus</i>	2,25	4,51	13,52
<i>R. norvegicus</i>	14,41	---	---

Fonte: RIVAROLI, L.

O filme radiográfico foi marcado pela luminescência gerando manchas ou borrões denominado de “*blots*”, cuja intensidade corresponde a expressão proteica da SERCA2a e do fosfolambano presentes nas membranas (Figura 24 e 25).

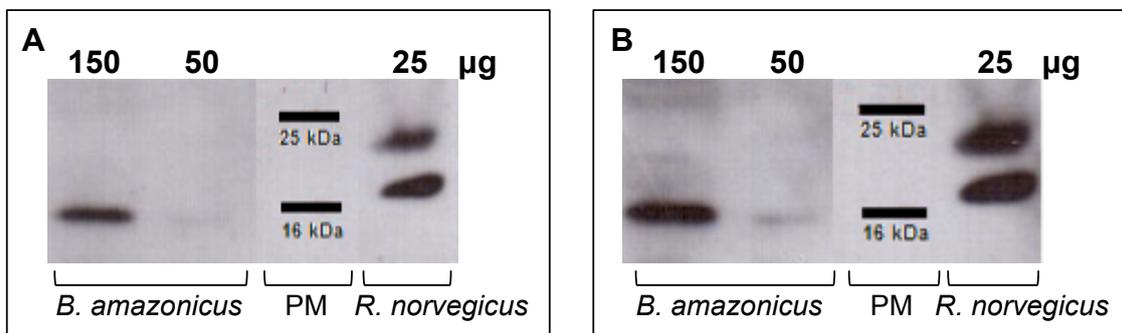
**Figura 24.** Análise da expressão da SERCA2a em ventrículos de *B. amazonicus* e ventrículo esquerdo do *R. norvegicus*. Os números acima indicam a quantidade de proteínas ( $\mu\text{g}$ ) carregadas no gel para a corrida. Abaixo os símbolos indicam: PM, marcador de peso molecular;  $F_T$ , Fração total de membranas e  $F_M$ , Fração microsomal. A seta indica a SERCA2a, com massa molecular estimada de 110 kDa, baseado na mobilidade relativa da proteína.



Fonte: RIVAROLI, L.

Para a revelação da membrana contendo a SERCA2a foi feita uma exposição de 7 minutos, enquanto que a exposição para revelação do fosfolambano mostrou melhores resultado com 5 minutos de exposição (Figura 25).

**Figura 25.** Análise da expressão do fosfolambano em ventrículos de *B. amazonicus* e em ventrículo esquerdo do *R. norvegicus*. A. exposição do filme radiográfico por 5 minutos. B. Exposição do filme radiográfico por 12 minutos. Os números acima da figura indicam a quantidade de proteínas ( $\mu\text{g}$ ) carregadas no gel para a corrida. Abaixo o símbolo PM indica marcador de peso molecular.



Fonte: RIVAROLI, L.

O alinhamento da estrutura primária da SERCA2a com o ClustalW mostrou grande similaridade na composição entre cão (*Canis lúpus*), camundongo (*Mus musculus*), rato (*Ratus norvegicus*), homem, (*Homo sapiens*), coelho (*Oryctolagus cuniculus*), galinha, (*Gallus gallus*) e o paulistinha (*Danio rerio*) (Figura 26).

A similaridade entre a SERCA2a dos organismos pôde ser verificada nas reconstruções filogenéticas pelos métodos de *Neighbor-Joining* e Máxima Verossimilhança (Figura 27). Nas duas reconstruções houveram valores altos de *bootstrap*, que significa a probabilidade em 100, após 1000 simulações matemáticas para aquele arranjo. A SERCA2a do *Danio rerio* o separou dos outros organismos, colocando-o numa posição isolada.

**Figura 26.** Alinhamentos múltiplos das sequências da SERCA2a obtidos com o programa clustalW, implementado nos software MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). O programa computacional Bioedit (Hall, 1999) foi utilizado para editar as sequências para que todas tivessem o mesmo tamanho nas análises subsequentes.

```

1                                                                                               130
Canis_lupu  MENAHTKTVE  EVLGHFVNE  STGLSLEQVK  KLKERWGSNE  LPAAEGKTL  ELVIEQFEDL  LVRILLLAAC  ISFVLAWFEE  GEETITAFVE  PFVILLILVA  NAIVGVWQER  NAENAIEALK  EYEPENMGKVY
Mus_muscul  MENAHTKTVE  EVLGHFVNE  STGLSLEQVK  KLKERWGSNE  LPAAEGKTL  ELVIEQFEDL  LVRILLLAAC  ISFVLAWFEE  GEETITAFVE  PFVILLILVA  NAIVGVWQER  NAENAIEALK  EYEPENMGKVY
Rattus_nor  MENAHTKTVE  EVLGHFVNE  STGLSLEQVK  KLKERWGSNE  LPAAEGKTL  ELVIEQFEDL  LVRILLLAAC  ISFVLAWFEE  GEETITAFVE  PFVILLILVA  NAIVGVWQER  NAENAIEALK  EYEPENMGKVY
Homo_sapie  MENAHTKTVE  EVLGHFVNE  STGLSLEQVK  KLKERWGSNE  LPAAEGKTL  ELVIEQFEDL  LVRILLLAAC  ISFVLAWFEE  GEETITAFVE  PFVILLILVA  NAIVGVWQER  NAENAIEALK  EYEPENMGKVY
Oryctolagu  MENAHTKTVE  EVLGHFVNE  STGLSLEQVK  KLKERWGSNE  LPAAEGKTL  ELVIEQFEDL  LVRILLLAAC  ISFVLAWFEE  GEETITAFVE  PFVILLILVA  NAIVGVWQER  NAENAIEALK  EYEPENMGKVY
Gallus_gal  MENAHTKTVE  EVLAYFVNE  STGLSLEQVK  KLKERWGSNE  LPAAEGKTL  ELVIEQFEDL  LVRILLLAAC  ISFVLAWFEE  GEETITAFVE  PFVILLILVA  NAIVGVWQER  NAENAIEALK  EYEPENMGKVY
Danio_reri  MENAHTKSVE  EVYSNFSVNE  STGLTLDQVK  RNRDKWGPNE  LPAAEGKSIW  ELVIEQFEDL  LVRILLLAAC  ISFVLAWFEE  GEETITAFVE  PFVILLILIA  NAIVGVWQER  NAENAIEALK  EYEPENMGKVY
Consensus  MENAHTKTVE  EVL..FgVNE  STGLsL#QVK  klk#kWG$NE  LPAAEGKtl  ELVIEQFEDL  LVRILLLAAC  ISFVLAWFEE  GEETITAFVE  PFVILLIL!A  NAIVGVWQER  NAENAIEALK  EYEPENMGKVY

131                                                                                               260
Canis_lupu  RQDRKSVQRI  KAKDIVPGDI  VEIavgdkvp  ADIRLtsIKS  TLRVDQsIL  TGESVsvIKH  TDPVDPpRAV  NQDKKNMlFS  GTNIAAGKAM  GVVvatGVNT  EIGKIRDEMv  ATEqERTPlQ  QKLDFEGeQL
Mus_muscul  RQDRKSVQRI  KAKDIVPGDI  VEIavgdkvp  ADIRLtsIKS  TLRVDQsIL  TGESVsvIKH  TDPVDPpRAV  NQDKKNMlFS  GTNIAAGKAM  GVVvatGVNT  EIGKIRDEMv  ATEqERTPlQ  QKLDFEGeQL
Rattus_nor  RQDRKSVQRI  KAKDIVPGDI  VEIavgdkvp  ADIRLtsIKS  TLRVDQsIL  TGESVsvIKH  TDPVDPpRAV  NQDKKNMlFS  GTNIAAGKAM  GVVvatGVNT  EIGKIRDEMv  ATEqERTPlQ  QKLDFEGeQL
Homo_sapie  RQDRKSVQRI  KAKDIVPGDI  VEIavgdkvp  ADIRLtsIKS  TLRVDQsIL  TGESVsvIKH  TDPVDPpRAV  NQDKKNMlFS  GTNIAAGKAM  GVVvatGVNT  EIGKIRDEMv  ATEqERTPlQ  QKLDFEGeQL
Oryctolagu  RQDRKSVQRI  KAKDIVPGDI  VEIavgdkvp  ADIRLtsIKS  TLRVDQsIL  TGESVsvIKH  TDPVDPpRAV  NQDKKNMlFS  GTNIAAGKAM  GVVvatGVNT  EIGKIRDEMv  ATEqERTPlQ  QKLDFEGeQL
Gallus_gal  RQDRKSVQRI  KARDIVPGDI  VEVAvgdkvp  ADIRltsIKS  TLRVDQsIL  TGESVsvIKH  TDPVDPpRAV  NQDKKNMlFS  GTNIAAGKAM  GVVvatGVNT  EIGKIRDEMv  ATEqERTPlQ  QKLDFEGeQL
Danio_reri  RQDRKSVQRI  KAKDIVPGDI  VEVAvgdkvp  ADIRltsIKS  TLRVDQsIL  TGESVsvIRH  TDPVDPpRAV  NQDKKNMlFS  GTNIAAGKAI  GVVvatGVNT  EIGKIRDEMA  STEqERTPlQ  QKLDFEGeQL
Consensus  RQDRKSVQRI  KAKDIVPGDI  VE!AVGDKVP  ADIRltsIKS  TLRVDQsIL  TGESVsvIkH  TDPVDPpRAV  NQDKKNMlFS  GTNIAAGKAm  GVV!ATGVNT  EIGKIRDEMv  ateqERTPlQ  QKLDFEGeQL

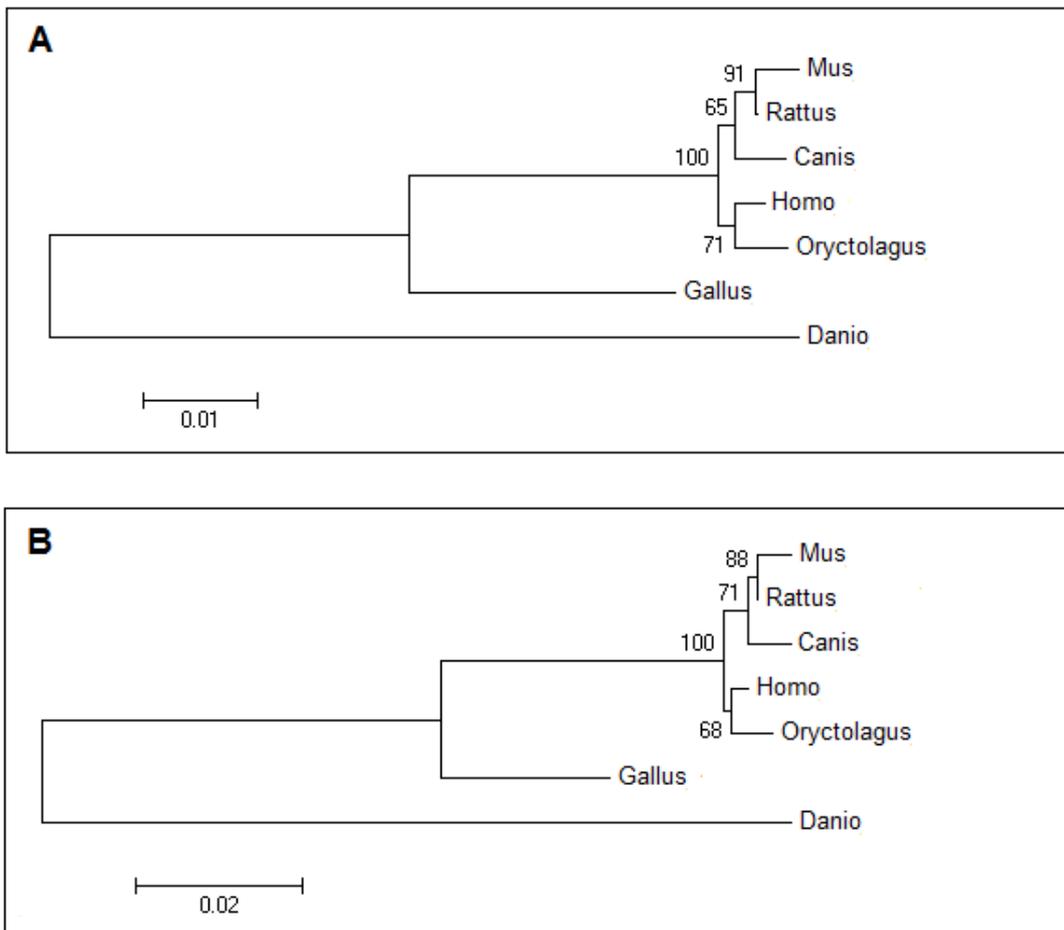
261                                                                                               390
Canis_lupu  SKVISLICIA  VWIINIGHFN  DPVHGGSWIR  GAIYYFKIAV  ALAVAAIPEG  LPAVITTCla  LGTRRMakKN  AIVRSLPSVE  TLGCTSVICS  DKTGTLTnQ  MSVCRMFILd  RVEGDtCSLn  EFTITGStYA
Mus_muscul  SKVISLICIA  VWIINIGHFN  DPVHGGSWIR  GAIYYFKIAV  ALAVAAIPEG  LPAVITTCla  LGTRRMakKN  AIVRSLPSVE  TLGCTSVICS  DKTGTLTnQ  MSVCRMFILd  KVEGDtCSLn  EFSITGStYA
Rattus_nor  SKVISLICIA  VWIINIGHFN  DPVHGGSWIR  GAIYYFKIAV  ALAVAAIPEG  LPAVITTCla  LGTRRMakKN  AIVRSLPSVE  TLGCTSVICS  DKTGTLTnQ  MSVCRMFILd  KVEGDtCSLn  EFTITGStYA
Homo_sapie  SKVISLICIA  VWIINIGHFN  DPVHGGSWIR  GAIYYFKIAV  ALAVAAIPEG  LPAVITTCla  LGTRRMakKN  AIVRSLPSVE  TLGCTSVICS  DKTGTLTnQ  MSVCRMFILd  RVEGDtCSLn  EFTITGStYA
Oryctolagu  SKVISLICIA  VWIINIGHFN  DPVHGGSWIR  GAIYYFKIAV  ALAVAAIPEG  LPAVITTCla  LGTRRMakKN  AIVRSLPSVE  TLGCTSVICS  DKTGTLTnQ  MSVCRMFILd  KVDGDtCSLn  EFTITGStYA
Gallus_gal  SKVISLICIA  VWIINIGHFN  DPVHGGSWIR  GAIYYFKIAV  ALAVAAIPEG  LPAVITTCla  LGTRRMakKN  AIVRSLPSVE  TLGCTSVICS  DKTGTLTnQ  MSVCRMFILd  KVEGDtCSLn  EFTVtGStYA
Danio_reri  SKVISLICIA  VWIINIGHFN  DPVHGGSWIR  GAVYYFKIAV  ALAVAAIPEG  LPAVITTCla  LGTRRMakKN  AIVRSLPSVE  TLGCTSVICS  DKTGTLTnQ  MSVCRMFILd  KAEgENCsLt  EFTISGStYA
Consensus  SKVISLICIA  VWIINIGHFN  DPVHGGSWIR  GA!YYFKIAV  ALAVAAIPEG  LPAVITTCla  LGTRRMakKN  AIVRSLPSVE  TLGCTSVICS  DKTGTLTnQ  MSVCRMFILd  kvEG#.CSLn  EFT!tGStYA

391                                                                                               520
Canis_lupu  PIGEVHKDDK  PVKCHQYDGL  VELATICALC  NDSALDYNEA  KGVYEKVGEE  TETALTCLVE  KMNvFDtELk  GLSkIERANA  CNSVIKQLMK  KEFTLEFSRD  RKSMsvYcTP  NKPSRTsMsk  MFVKGaPEGV
Mus_muscul  PIGEVQKDDK  PVKCHQYDGL  VELATICALC  NDSALDYNEA  KGVYEKVGEE  TETALTCLVE  KMNvFDtELk  GLSkIERANA  CNSVIKQLMK  KEFTLEFSRD  RKSMsvYcTP  NKPSRTsMsk  MFVKGaPEGV
Rattus_nor  PIGEVQKDDK  PVKCHQYDGL  VELATICALC  NDSALDYNEA  KGVYEKVGEE  TETALTCLVE  KMNvFDtELk  GLSkIERANA  CNSVIKQLMK  KEFTLEFSRD  RKSMsvYcTP  NKPSRTsMsk  MFVKGaPEGV
Homo_sapie  PIGEVHKDDK  PVNCHQYDGL  VELATICALC  NDSALDYNEA  KGVYEKVGEE  TETALTCLVE  KMNvFDtELk  GLSkIERANA  CNSVIKQLMK  KEFTLEFSRD  RKSMsvYcTP  NKPSRTsMsk  MFVKGaPEGV
Oryctolagu  PIGEVHKDDK  PVKCHQYDGL  VELATICALC  NDSALDYNEA  KGVYEKVGEE  TETALTCLVE  KMNvFDtELk  GLSkIERANA  CNSVIKQLMK  KEFTLEFSRD  RKSMsvYcTP  NKPSRTsMsk  MFVKGaPEGV
Gallus_gal  PMGEVHKDDK  LIKCSQYDGL  VELATICALC  NDSsLDYNEA  KGVYEKVGEE  TETALTCLVE  KMNvFDtDLK  GLSRIERANA  CNSVIKQLMK  KEFTLEFSRD  RKSMsvYcTP  NKPSRTsMsk  MFVKGaPEGV
Danio_reri  PEGDVCLDNR  IVKCSQYDGL  VELATICALC  NDSsLDFNES  KGVYEKVGEE  TETALTCLVE  KMNvFDtDVR  NLSKIERANA  CNAVikQLMK  KEFTLEFSRD  RKSMsvYcSP  NK-akSSSk  MFVKGaPEGV
Consensus  P.g#v.kd#k  .!KcsQYDGL  VELATICALC  NDSsLd$NEA  KGVYEKVGEE  TETALTCLVE  KMNvFDt#lk  gLskIERANA  CNSVIKQLMK  KEFTLEFSRD  RKSMsvYcTP  NKpsrtSmSk  MFVKGaPEGV

```



**Figura 27.** Reconstruções filogenéticas obtidas a partir das sequências de aminoácidos da SERCA2a utilizando os métodos de *Neighbor-Joining* (A) e Máxima Verossimilhança (B).



Fonte: RIVAROLI, L.

Com o programa *PPSearch* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/ppsearch/>) foram identificadas nas sequências de aminoácidos os sítios e motivos da SERCA2a de cada um dos indivíduos (Tabela 7).

Podemos notar que a SERCA2a de todos os mamíferos apresentam os mesmos sítios e motivos em igual quantidade. Já *G. gallus* apresenta dois possíveis sítios a mais de fosforilação para CK2 em comparação com mamíferos e um provável sítio exclusivo de fosforilação em um resíduo de tirosina. O *D. rerio* apresenta maior número ainda de alterações em relação aos mamíferos, com maior número de sítios de glicosilação, menor número de sítios envolvidos na fosforilação pela PKC, 4 sítios a mais para possível ligação com a CK2 e menor número de sítios myristyl.

**Tabela 7:** Nomes específicos, números de acesso das sequências nos bancos de dados e os tipos e número (n) de possíveis sítios ativos identificados nas análises da SERCA 2a. Diagramas esquemáticos dos sítios identificados podem ser visualizados nos Apêndices.

<b>Espécie</b>	<b>Números de acesso*</b>	<b>Sítios identificados (n)**</b>
<i>Mus musculus</i>	O55143-2	ASN-Glycosylation (6) PKC-Phospho-site (11) CK2-Phospho-site (11) Myristyl (12) ATPase_E1_E2 (1)
<i>Rattus Novergicus</i>	P11507-2	ASN-Glycosylation (6) PKC-Phospho-site (11) CK2-Phospho-site (11) Myristyl (12) ATPase_E1_E2 (1)
<i>Canis lupus</i>	NP_001003214.1	ASN-Glycosylation (6) PKC-Phospho-site (11) CK2-Phospho-site (11) Myristyl (12) ATPase_E1_E2 (1)
<i>Homo sapiens</i>	NP_001672.1	ASN-Glycosylation (6) PKC-Phospho-site (11) CK2-Phospho-site (11) Myristyl (12) ATPase_E1_E2 (1)
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	P20647	ASN-Glycosylation (6) PKC-Phospho-site (11) CK2-Phospho-site (11) Myristyl (12) ATPase_E1_E2 (1)
<i>Gallus gallus</i>	Q03669-2	ASN-Glycosylation (6) PKC-Phospho-site (11) CK2-Phospho-site (13) TYR-Phosoho-site (1) Myristyl (13) ATPase_E1_E2 (1)
<i>Danio rerio</i>	NP_00108404.1	ASN-Glycosylation (9) PKC-Phospho-site (10) CK2-Phospho-site (15) Myristyl (10) ATPase_E1_E2 (1)

**Fonte:** RIVAROLI, L.

\* Bancos de dados públicos acessados: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/>);

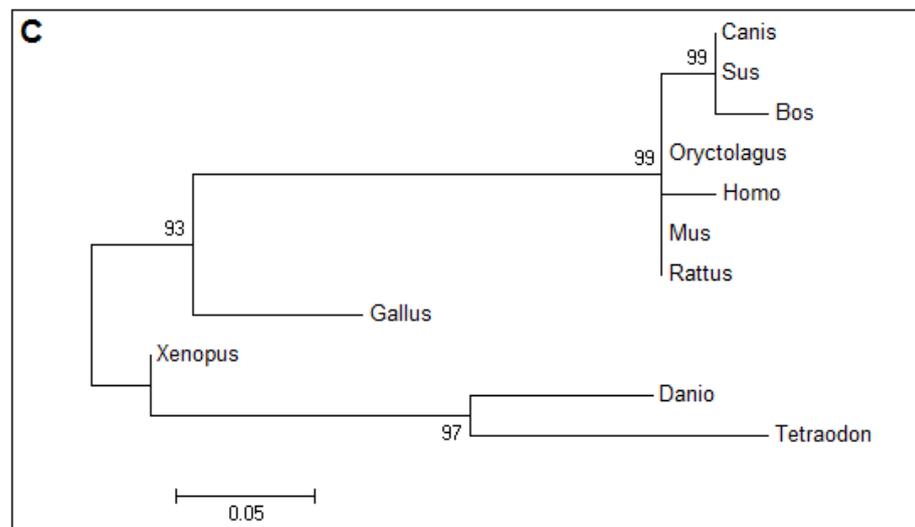
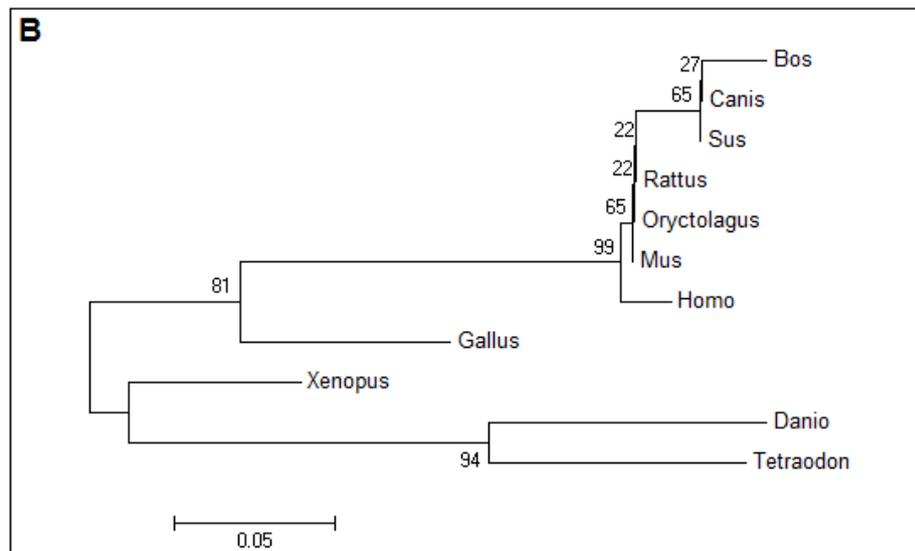
\*\* A busca por motivos foi realizada utilizando o programa PPSearch (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/ppsearch/>) que comparou as sequencias de aminoácidos das espécies analisadas ao banco de padrões de proteínas do PROSITE (<http://expasy.org/prosite/>) (Gasteiger *et al.*, 2005) na busca por sítios funcionais e domínios proteicos. Representações gráficas dos resultados observados em *M. musculus*, *O. caniculus*, *G. gallus* e *D. Rerio* estão apresentadas nos Apêndices (1a, 1b, 1c, 1d).

O alinhamento da estrutura primária do PLB seguiu a mesma metodologia utilizada para a SERCA2a e foi feita para as espécies: homem (*Homo sapiens*), coelho (*Oryctolagus cuniculus*), camundongo (*Mus musculus*), rato (*Ratus norvegicus*), vaca (*Bos taurus*), cão (*Canis lupus*), javali (*Sus scrofa*), galinha, (*Gallus gallus*), rã (*Xenopus tropicalis*), paulistinha (*Danio rerio*) e o baiacu (*Tetraodon nigroviridis*) (Figura 28). Foram alcançados altos valores de *bootstrap* nas duas reconstruções filogenéticas, principalmente no clado isolado dos teleósteos.

A busca por diferenças nos sítios no PLB das espécies examinadas mostra diferenças dos teleósteos para os mamíferos, apresentando um sítio exclusivo para uma possível interação com a PKC e um possível sítio de glicosilação exclusivo para teleósteos e anfíbios (Figura 29).

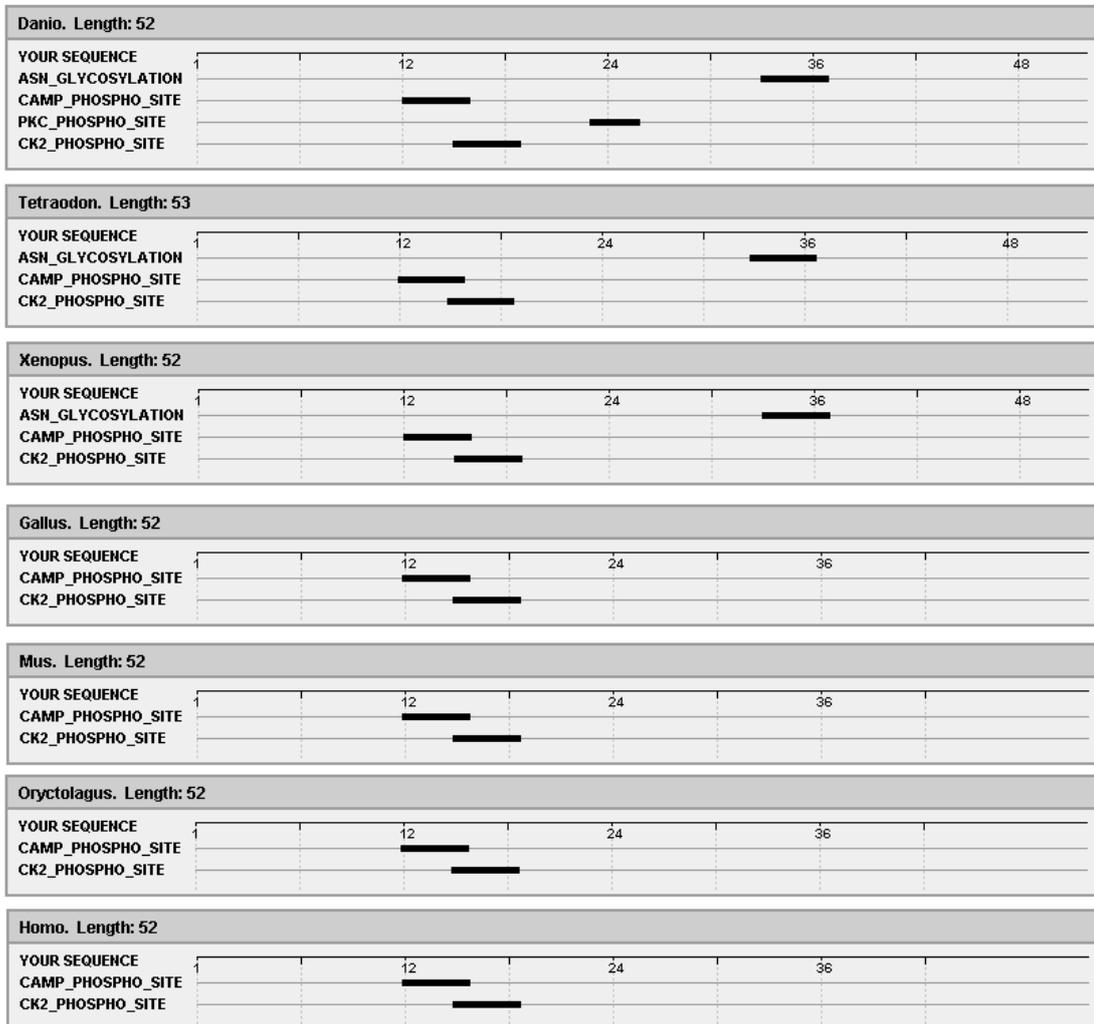
**Figura 28.** Alinhamento da sequência de aminoácidos do PLB (A); os pontos representam aminoácidos idênticos ao da primeira sequência (*Homo*) no sítio equivalente das outras espécies estudadas. Reconstruções filogenéticas obtidas a partir das sequências de aminoácidos da PLB utilizando os métodos de *Neighbor-Joining* (B) e Máxima Verossimilhança (C). Número de acesso das sequências utilizadas: *Canis familiaris* (P61012), *Sus scrofa* (P61013), *Bos taurus* (A4IFH6), *Oryctolagus cuniculus* (P61015), *Homo sapiens* (P26678), *Mus musculus* (P61014), *Rattus norvegicus* (P61016), *Gallus gallus* (P26677), *Xenopus (Silurana) tropicalis* (XM\_002932106.1), *Danio rerio* (XR\_045125.2), *Tetraodon nigroviridis* (CAG06667.1).

A	Homo	MEKVQYLTRSAIRRASTIEMPQQARQKLNLFINFLILLICILLICIIIVMLL
Oryctolagus	.....N.....	
Mus	.....N.....	
Rattus	.....N.....	
Bos	D.....N.....S.....	
Canis	D.....N.....	
Sus	D.....N.....	
Gallus	.....I.....L.....L.VNP.....R.E.V.....	
Xenopus	.....HI.....M.....N.VNP.T.N.E.V.S.....	
Danio	.....R.HM.....N.VNP.TKRN.D.I.S.....Y.L.M	
Tetraodon	.....R.HM.K.....Q.VNP.KRN.E.V.T.....Y.L.SS	



Fonte: RIVAROLI, L.

**Figura 29.** Diagrama esquemático dos domínios identificados na análise das sequências do PLB de sete espécies representativas do grupo. A localização dos sítios ativos esta evidenciada pelas barras pretas representadas nas figuras.



Fonte: RIVAROLI, L.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. ANÁLISE MECÂNICA DA CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA

A tensão isométrica máxima, definida como estresse isométrico (EI) é um índice muito interessante pois define a amplitude de força que pode ser executada pelo músculo numa dada condição. Nos experimentos de efeito do tempo (controle e rianodina) não foi observada variação significativa do EI ao longo do experimento, o que permite afirmar que experimentos realizados dentro do mesmo intervalo de tempo não tiveram variações decorrentes da deterioração da força de contração das preparações.

O mesmo foi observado pelos parâmetros de TPT e THR, que mantiveram-se estáveis ao longo do experimento, mostrando que não houve mudança na duração da contração e relaxamento. Além da importância para endossar a metodologia experimental, TPT e THR definem também características absolutas da onda de contração isométrica, sendo fundamentais para gerar novos parâmetros de análise que envolvam tempos de contração e relaxamento.

A comparação direta dos grupos controle e rianodina mostrou uma diferença significativa na capacidade de desenvolver tensão, até mesmo neste experimento que não envolve alteração da frequência de estimulação, como nos experimentos de relação força-frequência, ou ainda, nos experimentos de contração pós-pausa diastólica prolongada (BOSE *et al.*, 1988; RANTIN, *et al.*, 1998; AHO; VORNANEN, 1999; COSTA *et al.*, 2000; ANELLI *et al.*, 2004; RIVAROLI *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2006; OLLE, 2007). É evidente o comprometimento de desenvolvimento de tensão no miocárdio ventricular do matrinxã no grupo rianodina (Figura 8), no entanto, como o experimento é realizado com uma frequência de estimulação subfisiológica (0,2 Hz), a funcionalidade do RS pode estar alterada, implicando em uma mudança na sensibilidade do músculo ao fármaco, como verificado para truta arco-íris (HOVE-MADSEN, 1992). Além disso, não é possível estimar o nível de participação do RS neste experimento, já que a rianodina bloqueia o RS e torna o influxo de cálcio pela sarcolema ( $I_{Ca}$ ) mais acentuado, o que é verificado com o aumento da duração do potencial de ação em miócitos sob efeito da rianodina

(SHATTOCK; BERS, 1987). Estimar a participação do RS pela diferença entre o EI do grupos implicaria em subestimar a contribuição RS, já que a  $I_{Ca}$  estaria aumentada (BERS, 2001).

O TPT do grupo rianodina não apresentou alteração em relação ao grupo controle, no entanto, o THR apresentou uma elevação significativa ao longo de toda a sequência experimental. A não diferença entre os valores de TPT significaria que não houve alteração nos eventos relacionados à contração se a magnitude dos valores de força dos dois grupos fosse igual, no entanto, o EI reduzido do grupo rianodina com TPT equivalente ao do grupo controle significa que houve uma perda de eficiência (o mesmo tempo gasto para realizar processos com rendimentos diferentes). O comprometimento causado pela rianodina fica mais acentuado ao compararmos o THR dos grupos. O grupo controle apresenta um THR inferior e um EI superior, ou seja, realiza o relaxamento mais rapidamente a partir de um patamar maior de tensão.

Fica claro aqui a necessidade de um índice que mostre a taxa dos processos de contração e relaxamento, como a utilização da derivada da tensão isométrica pelo tempo ( $dTI/dt$ ) (SIEGEL; SONNENBLICK, 1963; SHIELS *et al.*, 1999; SHIELS; FARRELL, 2000) ou ainda relações entre o EI e o TPT e THR (SHIELS; FARRELL, 1997; THOMAZ *et al.*, 2009). A taxa de contração (TC) e a taxa inicial de relaxamento (TIR) foram calculadas para evidenciar a necessidade de um índice da variação da tensão em função do tempo (Figura 9). O TC indica claramente que o grupo rianodina apresenta valores reduzidos e que nesse experimento houve um comprometimento no processo contrátil, de fato. No mesmo experimento, é possível prever um dano aos mecanismos envolvidos no processo de relaxamento apenas observando as diferenças no THR, no entanto, o TIR torna o fenômeno explícito.

A relação força-frequência do ventrículo do matrinxã apresentou o efeito escada negativo, que quer dizer que ocorre a redução do EI com a elevação da frequência, como na maioria dos teleósteos: sea raven (*Hemirhamphys americanus*), alewife (*Alosa pseudoharengus*), cavala do atlântico (*Scomber scombrus*) (DRIEDZIC; GESSER, 1985), linguado (*Pleuronectes flesus*) (EL-SAYED; GESSER, 1989), carpa cruciana (VORNANEN, 1989), truta arco-íris (HOVE-MADSEN; GESSER, 1989) emborê (RANTIN *et al.*, 1998), pacu (ANELLI *et al.*, 2004) e muçum

(ROCHA *et al.*, 2007). Este efeito está provavelmente relacionado à redução da concentração  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico sistólico  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  causado pela redução do influxo pela sarcolema via canais L; reduzida concentração citosólica de  $\text{Na}^+$  ( $[\text{Na}^+]_i$ ), que impede a troca pelo  $\text{Ca}^{2+}$  via trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) (modo reverso) no início do potencial de ação e/ou uma redução do estoque e liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (SHIELS *et al.*, 2002).

O controle do equilíbrio dinâmico da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é o principal mecanismo celular responsável pela relação força-frequência (ENDO, 2004) e a elucidação dos mecanismos envolvidos do manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  no acoplamento excitação-contração é essencial para entender o efeito escada negativo apresentado pelo *B. amazonicus* e outras espécies. A elevação da frequência de estimulação reduz o EI acima de 0,4 Hz, o que inclui a taxa de contração fisiológica (1,05 Hz) observada no repouso *in vivo* (OLLE, 2007), sugerindo que estão ocorrendo reduções na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sistólico.

O efeito escada negativo foi mantido quando as preparações foram expostas à rianodina, mas a curva do EI ocorreu com menor magnitude. Essa redução na frequência de trabalho fisiológica demonstra uma contribuição efetiva do RS para o desenvolvimento de força no ventrículo de *B. amazonicus*.

Adicionalmente foi calculada a contribuição do RS para o EI, que mostrou que a participação do RS é superior à participação do cálcio extracelular para elevação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sistólico (canais tipo L e NCX no modo reverso). É importante considerar que este cálculo não prediz exatamente a participação do RS, pois a utilização da rianodina altera o funcionamento dos mecanismos sarcolemas, elevando a  $I_{\text{Ca}}$ , ou seja, os valores de contribuição do RS no ventrículo do *B. amazonicus* estão subestimados, o que significa que a contribuição do RS é ainda maior (BERS, 2001). Para prever a contribuição da sarcolema e RS de uma maneira mais precisa, seria interessante conhecer as correntes iônicas sarcolemas por experimentos de *patch-clamp* e a influência que o bloqueio do RS com rianodina pode causar, assim, poderia ser calculada a alteração na  $I_{\text{Ca}}$  e poderiam ser realizadas as devidas correções para o cálculo da contribuição efetiva do cálcio intra e extracelular do *B. amazonicus*.

O débito cardíaco, produto do volume sistólico pela frequência cardíaca, se assemelha com determinada limitação ao índice de capacidade de bombeamento

cardíaco (CBC), e tem sido utilizado para avaliar a relação entre força e frequência (MATIKAINEN; VORNANEN, 1992). *B. amazonicus* apresentou maiores CBC entre 0,8 e 1,0 Hz, demonstrando a maior eficiência do trabalho ventricular nestas frequências, mesmo com valores reduzidos de EI quando comparado com as menores frequências. A faixa de valores ótimos para CBC compreendem a frequência cardíaca observada *in vivo*, sugerindo um mecanismo de economia energética para o trabalho cardíaco.

Na truta arco-íris e no atum (*Thunnus albacares*), a exposição de tiras ventriculares à rianodina alterou a curva com os valores ótimos de CBC para baixo (menor amplitude) e para esquerda (menores frequências) (SHIELS; FARRELL, 1997; SHIELS *et al.*, 1999). Na cavala do pacífico (*Scomber japonicus*), a frequência ótima para a CBC foi em torno de 1,8 Hz a 15 °C e a exposição à rianodina mudou faixa de frequência ótima para valores entre 0,2 e 1,2 Hz. (SHIELS; FARRELL, 2000). No *B. amazonicus*, a rianodina achatou e alterou a curva da CBC para baixo, tornando a faixa ótima de frequência mais ampla (0,6 a 1,6 Hz), sugerindo que os mecanismos sarcolemais de ciclagem do  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  ATPase sarcolemal e NCX) não são tão afetados com a elevação da frequência, mesmo com sua reduzida contribuição para a produção de tensão.

No miocárdio ventricular do *B. amazonicus*, tanto TPT quanto THR foram encurtados pelo aumento da frequência, o que está relacionado com a redução do tempo para realizar cada ciclo de contração e relaxamento (Figura 11). TPT e THR não são no entanto bons indicadores para a cinética de contração, já que não se leva em consideração a magnitude da tensão desenvolvida naquele dado tempo. Esta afirmação torna-se clara quando as derivadas do EI pelo tempo são comparadas com esses valores absolutos (Figuras 14 e 15). É possível notar que as reduções do TPT ocorrem em todas as frequências a partir de 0,2 Hz, enquanto as reduções da TMC ocorrem apenas acima de 1,0 Hz e da TMedC acima de 1,4 Hz. Pode-se concluir que apesar da progressiva redução dos valores de TPT, a eficiência dos mecanismos contráteis são mantidos até uma faixa entre 1,0 e 1,4 Hz, o que é corroborado pela redução da CBC apenas acima dessa faixa de frequências.

A redução da TMC contrasta com o aumento da derivada da força pelo tempo (dF/dT) para a cavala do pacífico (*S. Japonicus*) (SHIELS; FARRELL, 2000), um membro da família Scombridae que inclui espécies com especializações morfológicas e fisiológicas para a natação rápida e modo de vida migratório, como os atuns e bonitos (LANDEIRA-FERNANDEZ *et al.*, 2004). Essa espécie apresenta uma relação força-frequência positiva e praticamente a ausência de uma porção descendente da curva de CBC, mostrando que a mais alta eficiência de bombeamento ocorre nas maiores frequências de contração. Esse resultado sugere que *B. amazonicus* e *S. japonicus* devem adotar diferentes estratégias para manter o acoplamento excitação contração: ajustes cronotrópicos provém a eficiência cardíaca para *S. japonicus* já que a eficiência cardíaca apresenta um aumento diretamente proporcional à frequência, enquanto a modulação inotrópica parece ser mais importante para *B. amazonicus*, já que haveria uma estreita faixa de frequências com eficiente capacidade de bombeamento cardíaco. Experimentos de esforço físico seriam necessários para testar esta hipótese.

O contraste entre TPT e a TMC foi ainda maior quando comparados no grupo exposto à rianodina. Não há diferenças entre os valores de TPT nos grupos controle e rianodina, mas em todas as frequências a TMC do grupo rianodina foi inferior ao do grupo controle, sem alterações significativas com a elevação da frequência. Considerando a funcionalidade do RS no miocárdio do *B. amazonicus*, esses dados sugerem que os mecanismos de ciclagem de  $Ca^{2+}$  são os componentes mais sensíveis aos incrementos da frequência. Adicionalmente, o RS parece ser essencial para manter a eficiência da contração já que, por ser um reservatório intracelular, diminui as distâncias difusionais e deve acelerar o processo contrátil.

As mesmas observações realizadas para o TPT e TMC se aplicam ao THR e TMR. O THR foi encurtado com a elevação da frequência em ambas os grupos controle e rianodina. De acordo com SHIELS; FARRELL (1997), o encurtamento do THR pela rianodina quando há funcionalidade do RS, é resultado de uma extrusão mais rápida do  $Ca^{2+}$  devido à reduzida  $[Ca^{2+}]_i$  (SHIELS; FARRELL, 1997). No presente estudo, a comparação entre THR e TMR tanto para grupo controle e rianodina demonstraram que a redução do THR durante a elevação da frequência está relacionada exclusivamente à redução do EI, já que não houve alteração na TMR, ou seja, o TPT foi proporcional em cada frequência experimental ao EI

executado. O grupo exposto à rianodina teve a curva da TMR elevada com os incrementos da frequência, mostrando que o ventrículo do *B. amazonicus* depende do sequestro de  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA para relaxar mais eficientemente.

A TMC e a TMR são taxas baseadas nas maiores velocidades instantâneas do processo de contração e relaxamento, respectivamente e mostra-se um índice bastante interessante para mostrar a eficiência desses processos (SIEGEL; SONNENBLICK, 1963; SHIELS *et al.*, 1999; SHIELS; FARRELL, 2000; TIITU; VORNANEN, 2002). No entanto, este é um índice que mostra um único ponto do processo, a exemplo do que ocorre com o EI, não contando com a morfologia de todos os pontos da curva de tensão isométrica para analisar a taxa média ao longo do processo.

As TMedC e TMedR foram calculadas com a média de todas as velocidades instantâneas do processo de contração e relaxamento e mostraram uma magnitude de valores inferior aos observados para TMC e TMR. Como os valores de TMC são os pontos extremos da derivada na fase de contração, foi identificada uma diferença significativa precoce ao longo dos incrementos da frequência em relação aos valores iniciais, muito provavelmente pela natureza aguda dos dados. A TMedC por outro lado, representa uma velocidade média de todo o processo (semelhante à aproximação TC), e representa mais efetivamente a taxa de todo o processo, incluindo a variação de velocidades instantâneas que ocorre ao longo da contração. A consequência fundamental da utilização dessa taxa pode ser observada na frequência em que há o comprometimento do processo de contração, 1,4 Hz, em contraste com o que foi observado para TMC a 1,0 Hz, o que mostra que o comprometimento da taxa de contração deve ocorrer em frequências “suprafisiológicas”, garantindo que exista uma reserva de desempenho para o desenvolvimento de frequências maiores.

Como já não haviam sido identificadas alterações na TMR, também não o foram na TMedR, o que seria de se esperar já que os dados de TMR seriam superestimados em relação aos de TMedR, como discutido acima.

A ITI ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}$ ) representa a quantidade de tensão desenvolvida durante cada contração. SIEGEL; SONNENBLICK (1963) calcularam a ITI sistólica de papilar ventricular canino, ou seja, somente para a fase de contração e também observaram

o efeito escada negativo para ITI. No entanto, a exemplo do que foi verificado na comparação entre TMC e TMedC, ITI utiliza todos os pontos de tensão isométrica da curva de contração, tornando-se mais representativo para realizar comparações do que apenas os pontos máximos de tensão (EI). Os valores de ITI para o grupo controle mostraram o mesmo comportamento observado para o EI, em contrapartida, foi identificado um comprometimento mais precoce do desenvolvimento de tensão (a partir de 0.4 Hz) no grupo rianodina em relação aos valores iniciais.

Para comparações da eficiência dos valores de ITI, foi calculado o ITIPM, que seria o total de tensão produzida pelas contrações dentro do intervalo de tempo de um minuto ( $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{min}$ ). Este cálculo foi realizado para permitir comparações com a CBC. O músculo papilar canino exibiu os valores máximos de ITI a 2,0 Hz, uma frequência ótima inferior à observada para  $dF/dT$  (2,5 Hz) (SIEGEL; SONNENBLICK, 1963). *B. amazonicus* apresentou redução da TMR acima de 1,0 Hz e uma faixa ótima de ITI de 0,4 a 0,8 Hz, sugerindo que a habilidade para aumentar ou manter a  $dF/dT$  é necessária para alcançar uma maior eficiência das contrações com a elevação da frequência. Considerando que a ITI fornece informação mais consistente sobre o evento contrátil do que apenas o pico de tensão (EI) e seus índices derivados, pode-se então supor que a faixa de frequência ótima para o desenvolvimento de tensão isométrica no ventrículo do *B. amazonicus* é menor do que aquela mostrada para a CBC.

De fato, a análise da CBC mostra que mesmo os baixos valores observados nas mais altas frequências são similares àqueles obtidos a 0,2 Hz. Esta resposta pode representar uma importante adaptação, já que o coração pode contrair a altas frequências e manter a CBC mesmo apresentando o efeito escada negativo.

Por outro lado, a análise do ITIPM mostra um outro cenário: os valores de ITIPM a 1,6 e 1,8 Hz são significativamente menores do que os valores a 0,2 Hz, sugerindo um comprometimento do desenvolvimento da tensão nessas altas frequências. A exposição à rianodina alterou a curva da ITIPM para a esquerda e para baixo, reforçando a importância do RS para o desenvolvimento de tensão no miocárdio ventricular de *B. amazonicus*.

SHIELS; FARRELL (1997) encontraram para a truta arco-íris faixas de frequência ótimas para a CBC superiores ou iguais aos valores encontrados para a frequências observadas *in vivo*. SHIELS *et al.* (1999) encontraram o mesmo padrão para o atum (*Thunnus albacares*). A ITIPM mostra uma faixa de frequência ótima para o trabalho ventricular do *B amazonicus* menor do que o observado em repouso *in vivo* (OLLE, 2007).

Este é um ponto crítico para a validação dos dados de ITIPM, pois como considera toda a área sob a curva de tensão, leva em consideração a fase de relaxamento, quando a tensão diminui. Fisiologicamente, a fase de desenvolvimento de tensão do miocárdio está relacionada a criação de pressão sistólica em oposição à pressão arterial para a propulsão do sangue. A partir do momento em que a contração supera a pressão arterial, o sangue passa a fluir para o leito arterial e a contração passa a não ser mais isométrica. A inclusão da faixa de relaxamento da curva de contração no cálculo da integral significa incluir na análise uma fase do ciclo de contração/relaxamento que pode não estar relacionado ao trabalho cardíaco, pois uma vez reduzida a força de contração, o sangue já foi propulsionado, constituindo-se assim em uma quantidade de tensão observada em preparações isométricas que não tem um significado claro para o trabalho do miocárdio. A ITI, como utilizada por SIEGEL; SONNENBLICK (1963), incluindo apenas a fase de contração parece mais apropriada para a avaliação da quantidade de tensão para a contratilidade do que os índices ITI ou ITIPM aqui utilizados, pois guarda maiores semelhanças com a natural contração isométrica do ciclo cardíaco.

A utilização da quantidade de tensão produzida na contração isométrica é uma informação que merece mais crédito por parte dos pesquisadores. No presente trabalho foi demonstrado no entanto, que é uma medida que deve ser usada com critérios e que é necessário entender o contexto da contração isométrica para o significado biológico para a validação dos resultados. Outra tentativa de utilização da quantidade de tensão produzida na preparação isométrica foi a elaboração do índice de contratilidade (IC). A ideia para a elaboração desse índice surgiu da discussão sobre a validade de utilizar ou não a integral da tensão isométrica com os professores José W. Bassani e Rosana Bassani, durante a Reunião Anual da FeSBE de 2010, e as seguintes questões foram levantadas:

- A integral traz o problema da utilização da fase de relaxamento, que se for prolongada pode aumentar a área (e o valor da integral) sem implicar em trabalho cardíaco;
- Uma contração fraca, mas prolongada, também implica numa quantidade de tensão pouco significativa para o trabalho cardíaco, mesmo utilizando-se apenas a fase de contração, como SIEGEL; SONNENBLICK (1963);
- Índices como a derivada são úteis pois refletem uma relação entre a tensão e tempo. O desempenho cardíaco está relacionado com a execução de tensão em curtos espaços de tempo, afim de criar a pressão sistólica capaz de movimentar o sangue, contra a pressão arterial para a abertura das válvulas ventrículo-arteriais;

Neste sentido, o IC foi criado levando-se em consideração a integral da curva de contração isométrica referente apenas à fase ascendente. Foi considerado que o EI é diretamente proporcional a capacidade de realizar trabalho cardíaco, uma vez que é a amplitude máxima de tensão desenvolvida. A implicação da duração do evento foi levada em consideração, assumindo que contrações mais rápidas são mais efetivas, e considerou-se que o TPT é inversamente proporcional ao trabalho. É interessante notar que o TPT além de ser o tempo decorrido para atingir o pico de tensão, também é o tempo decorrido na fase ascendente da curva de contração isométrica.

É esperada uma relação entre o IC e a eficiência da contratilidade, que permita comparações em diferentes condições de uma espécie, ou em espécies distintas, pois este índice é calculado a partir de valores absolutos. Não foi objetivo desse índice interpretar o significado da sua grandeza física.

O comprometimento do IC ocorreu mais precocemente do que nos outros índices utilizados (EI e ITI). É interessante notar que o IC foi calculado utilizando em parte o ITI e o EI, dois índices da tensão produzida, que não utilizam uma referência temporal. Levando-se em consideração a amplitude máxima de tensão (EI) ou a quantidade de tensão (ITI) não foi possível detectar uma redução significativa da eficiência de contração em frequências reduzidas, detectadas pelo IC, mostrando

que o miocárdio do *B. amazonicus* tem uma sensibilidade maior à elevação da frequência.

O grupo rianodina também mostrou-se diferente no que se refere à sensibilidade às alterações de frequência, mostrando uma sensibilidade menor (redução significativa acima de 0,6 Hz) a essa variação em comparação com a ITI e a mesma que o IC. Essa menor sensibilidade à elevação da frequência está de acordo com os resultados de TMC e TMedC, que não apresentaram mudanças ao longo das alterações de frequência. Esse conjunto de resultados leva mais uma vez ao questionamento de que os mecanismos de manejo de cálcio relacionados a sarcolema não são prejudicados com os incrementos da frequência, ao contrário do manejo do  $Ca^{2+}$  do RS, que reduz sua participação gradativamente.

O ICPM, que relaciona-se, dentro de certos limites, ao débito cardíaco, mostrou que a faixa ótima de trabalho do ventrículo do *B. amazonicus* é mais ampla do que os outros índices. Considerando o maior valor obtido como referência para o melhor rendimento (302.2 mN.mm<sup>-2</sup> na frequência de 0,8 Hz), é possível observar uma faixa de frequência ótima para o ICPM entre 0,6 e 1,4 Hz, mais ampla do que as anteriormente observadas (CBC; 0,8 a 1,0 Hz e ITIPM; 0,4 a 0,8), o que permite ao animal uma possibilidade maior para a variação da frequência cardíaca, mantendo a eficiência em frequências menores e maiores que a frequências fisiológicas. O ponto positivo para a utilização do ICPM seria justamente mostrar que não há prejuízo da eficiência da contratilidade em frequências superiores à frequência de repouso. O mesmo foi observado por SHIELS; FARRELL (1997) com a truta arco-íris e por SHIELS *et al.* (1999) com o atum (*Thunnus albacares*), onde a faixa ótima de frequência apresentada para a CBC foi maior ou igual a frequência observada *in vivo*.

O ICPM do grupo rianodina apresentou uma relação diretamente proporcional à elevação da frequência, mais uma vez mostrando a capacidade dos mecanismos de ciclagem de cálcio da sarcolema em manter seu desempenho frente a elevações da frequência. O cálculo da contribuição do RS também mostrou a clara contribuição majoritária do RS, principalmente na faixa de frequências que compreende as frequências fisiológicas.

## 5.2. ANÁLISE BIOMOLECULAR

A atividade da SERCA2a é diretamente responsável pela funcionalidade do RS e seu envolvimento no acoplamento E-C cardíaco, e dessa maneira a expressão protéica de ambas SERCA2a e PLB foram estudadas pelas técnicas *Western Blot* (Figuras 20 e 21).

O modelo neutralista de Kimura prediz uma baixa taxa de mutação em moléculas com intensa restrição funcional (KIMURA, 1983). Neste sentido, é esperado que haja uma alta conservação e similaridade em moléculas homólogas e essenciais para a atividade metabólica das células, tal como proteínas relacionadas à ciclagem do  $\text{Ca}^{2+}$  cardíaco.

O anticorpo anti-SERCA (sc-8095) policlonal foi capaz de se ligar especificamente à estrutura da SERCA2a do *B. amazonicus*, mesmo sendo construído contra SERCA2a humana. Fica claro que neste caso existe homologia entre as SERCA2a das duas espécies, no entanto, outros anticorpos anti-SERCA foram testados e não foram bem sucedidos, como o ab2861 (ABCAM, Cambridge, Inglaterra - dados não mostrados), o que demonstra que apesar da similaridade identificada com o sc-8095, também existem diferenças na estrutura proteica suficientes para gerar uma inespecificidade imunológica. É importante ressaltar que foram realizadas muitas tentativas para a padronização do *Western Blot* da SERCA2a (dados não apresentados) e que a reação de *immunoblotting* só foi possível através da utilização da fração microssomal de ventrículos e com a utilização de uma quantidade elevada de proteínas (100  $\mu\text{g}$ ) quando comparada a necessária para se obter a expressão protéica da SERCA2a em *R. norvegicus*.

A fração microssomal que representa vesículas soltas formadas a partir de fragmentos do retículo (ALBERTS *et al.*, 2004) apresenta, logicamente, maior densidade da SERCA2a do que todo o sistema de membranas da célula. As comparações entre a os *blots* das frações microssomais de 100  $\mu\text{g}$  do *B. amazonicus* e 25  $\mu\text{g}$  e do *R. norvegicus*, demonstra que há provavelmente uma densidade muito maior da proteína no mamífero, apesar da clara dependência do RS pelo miocárdio ventricular do teleósteo. A questão da menor afinidade entre o anticorpo e a SERCA2a do teleósteo pode ser levantada e a pequena intensidade do

*blot* nesse caso poderia ser consequência da ligação antígeno-anticorpo de baixa afinidade, quando comparada à do mamífero.

Poderia ser questionado também o fato de concentrações maiores que 100 µg não terem apresentado melhores resultados, já que apresentariam maior quantidade de proteínas para a ligação com o anticorpo. A quantidade de proteína na amostra é um passo crítico para uma boa resolução da banda no gel (WAI-HOE, 2009), a malha do gel de 7,5 % de poliacrilamida pode ser estreita para a migração de 200 e 300 µg, essa sobrecarga de proteínas pode se tornar um grande amontoado, não permitindo a correta migração das moléculas (PROTOCOLO DO LABORATÓRIO DE ELETROFORESE DE PROTEÍNAS, UWSP, EUA), o que pode ser percebido pela falta de resolução nessas bandas (Figura 20).

Os experimentos de *immunoblotting* do PLB, por outro lado, não apresentaram a dificuldade de execução encontrada nos experimentos com a SERCA2a e não foram necessárias muitas tentativas para alcançar resultados satisfatórios, o que sugere amostras com maior quantidade de PLB e/ou maior afinidade pelo anticorpo anti-PLB.

Uma maior afinidade pelo anticorpo implicaria em maior grau de conservação do PLB, que é uma proteína de pequenas dimensões (apenas 16 kDa e 52 aminoácidos), considerando que esta é uma proteína de grande importância funcional para o metabolismo e que não apresenta muitas possibilidades de alteração, sem o comprometimento de sítios ativos funcionais, é de se esperar que esta proteína seja mais conservada, guardando maiores semelhanças estruturais com proteínas homólogas de outras espécies. Uma consequência dessa hipótese seria a ligação de alta afinidade ente o PLB do teleósteo e o anticorpo produzido para o PLB de bovino, como pôde ser notado pelos resultados do *Western Blot* apresentados.

Considerando o conjunto de dados do *Western Blot* e da análise mecânica, é possível analisar a resposta contrátil do *B. amazonicus* frente a elevação da frequência, nos apropriando das seguintes informações:

- Mamíferos de uma maneira geral apresentam uma grande dependência dos estoques de  $Ca^{2+}$  do RS para a contração do

miocárdio (BERS, 2002) e podem apresentar uma relação força-frequência positiva (coelhos, furões e humanos) com elevação da  $[Ca^{2+}]_i$  pelo aumento do conteúdo do RS devido à maior entrada de  $Ca^{2+}$  em ciclos mais curtos, ou negativa, (camundongos e ratos) que trabalham com seus RS “repletos” mesmo à baixas frequências, limitando o aumento do seu conteúdo com elevação da frequência, gerando uma relação força-frequência negativa (BERS, 2002).

- Teleósteos como o bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*; DRIEDZIC; GESSER, 1988) a cavala do pacífico (*Scomber japonicus*; SHIELS; FARRELL, 2000), o atum skipjack (*Katsuwonus pelamis*; KEEN *et al.*, 1992), o atum yellowfin (*Thunnus albacares*; SHIELS *et al.*, 1999), apresentaram capacidade de, pelo menos em parte da curva de força-frequência, manter uma relação força-frequência positiva.
- Atum, cavala e bacalhau são peixes de natação rápida, considerados “peixes atléticos” (TIBBITS *et al.*, 1992) e a funcionalidade do RS pode representar uma adaptação ao seu modo de vida.
- Atuns e cavalas (Atum bluefin do pacífico, *Thunnus orientalis*; atum albacore, *Thunnus alalunga*; atum yellowfin, *Thunnus albacares*; atum bigeye, *Thunnus obesus*; atum bluefin do pacífico, *Thunnus orientalis* e a cavala do Pacífico, *Scomber japonicus*) apresentam forte expressão da SERCA2a, com atividade enzimática elevada (LANDEIRA-FERNANDEZ *et al.*, 2004; CASTILHO *et al.*, 2007).

Como discutido anteriormente, a provável causa relacionada ao inotropismo negativo nas elevações da frequência de estimulação é a redução do  $[Ca^{2+}]_i$  (SHIELS *et al.*, 2002). A queda do  $[Ca^{2+}]_i$  pode ser provocada pela queda dos estoques de  $Ca^{2+}$  do RS, pela redução da fração de  $Ca^{2+}$  liberada pelo RS a cada ciclo cardíaco ou ainda pela perda  $Ca^{2+}$  para o meio extracelular (BERS, 2000).

A funcionalidade do RS, verificada pela sensibilidade à rianodina e pela expressão proteica, aliada ao efeito escada negativo sugerem um possível déficit de  $Ca^{2+}$ , por perda para o meio extracelular pelos mecanismos sarcolemais (NCX e  $Ca^{2+}$  ATPase da sarcolema), ou ainda, a impossibilidade de aumentar o conteúdo e/ou fração de liberação do  $Ca^{2+}$  do RS, pelo mesmo já estar trabalhando no limite máximo.

### 5.3. EVOLUÇÃO MOLECULAR

A única sequência da SERCA2a disponível para análise em teleósteos foi a pertencente ao paulistinha (*Danio rerio*), provavelmente por este ser considerado um organismo modelo e haver grande quantidade de informação sobre seu genoma disponível nos bancos de dados públicos. Mesmo nesse organismo modelo, a sequência de aminoácidos da SERCA2a ainda não foi estudada experimentalmente, sendo sua sequência predita *in silico*, o que não comprometeu as análises de evolução molecular, pois considerando a similaridades nos alinhamentos, e os valores de *bootstrap*, houve um alto grau de probabilidade de acerto (Figuras 24 e 25).

No caso da SERCA2a o modelo neutralista de KIMURA (1983) se aplica, considerando que a SERCA2a é uma proteína com forte pressão seletiva e que deve ser conservada ao longo do processo evolutivo. A evidência para tal afirmação está na alta similaridade das sequências dos aminoácidos, no compartilhamento de motivos proteicos entre o *D. rerio* e mamíferos, além dos resultados obtidos com o *Western Blot*, onde o anticorpo específico para a SERCA2a humana foi capaz de se ligar à proteína homóloga do *B. amazonicus*.

Apesar de pretenciosas, as especulações sobre a validade da comparação entre a SERCA2a de teleósteos e mamíferos tem um forte suporte dos métodos de bioinformática utilizados. A partir do alinhamento dois métodos de reconstrução filogenética foram utilizados, o Neighbor-Joining e a Máxima Verossimilhança, com metodologias de análise distintas e baseados em métodos estatísticos (*Bootstrapping*), ambos deram suporte para uma similaridade entre a SERCA2a de *D. rerio* e mamíferos, assim como o experimento de *Western Blot* mostrou haver similaridade entre a mesma proteína do *B. amazonicus* e de humanos.

Domínios proteicos pertencentes a uma determinada família geralmente compartilham características funcionais e são derivados de um ancestral comum e é visível que certas regiões permanecem mais conservadas que outras durante a evolução, essas são regiões importantes para a estrutura e função das proteínas e estão relacionada com a pressão seletiva (LUND *et al.*, 2005). É fato que do ponto de vista evolutivo o *D. rerio* e o *B. amazonicus* podem ser tão diferentes entre si quanto o são dos mamíferos, no entanto, a especificidade da ligação antígeno-

anticorpo no experimento do *Western Blot* e a similaridade estrutural observada nas análises computacionais corroboram para que tais especulações façam sentido.

O fato de outros anticorpos anti-SERCA2a não terem apresentado afinidade pela proteína do peixe, mostra que as moléculas não são idênticas, havendo epítomos diferentes, que influenciam na ligação antígeno-anticorpo. As proteínas se enovelam na conformação de mais baixa energia e uma das consequências disso é a internalização dos sítios hidrofóbicos da proteína (ALBERTS *et al.*, 2004). A distribuição dos sítios de hidrofobicidade de uma proteína podem dar ideia se aquele determinado segmento está exposto na superfície da molécula ou escondido. No presente estudo, a figura apresentada no Apêndice 3 revela uma leve diferença na composição dos aminoácidos que pode gerar tênues diferenças entre os sítios de hidrofobicidade/hidrofilicidade do *D. rerio* em relação aos mamíferos e à galinha (entre o resíduo 500 e 600 e próximo ao resíduo 900, Apêndice 2), essas diferenças podem indicar diferenças nos epítomos dessas proteínas.

A diferença entre os motivos preditos para os homólogos da SERCA2a é um forte indício para essa hipótese. No entanto, alinhamentos de predição da estrutura terciária dos homólogos da SERCA2a são necessários para atestar tal afirmação. A partir da estrutura terciária é possível identificar os epítomos da SERCA2a que, em última estância, são os responsáveis pela formação dos CDRs dos anticorpos. Essa informação pode ser extremamente útil para o desenvolvimento de anticorpos para estudos de *immunoblotting* ou imunohistoquímica, pois a sensibilização do sistema imunológico de um organismo com os fragmentos de peptídeos comuns aos homólogos da SERCA2a pode resultar na formação de um anticorpo com espectro mais amplo de ação em diferentes vertebrados.

## 6. CONCLUSÕES

a. Com a utilização do estresse isométrico (EI), tanto nos experimentos de efeito do tempo quanto nas diferentes frequências estimulatórias, foi possível identificar que o miocárdio ventricular de *B. amazonicus* é sensível à rianodina, sendo o RS a principal fonte de cálcio ativador. O EI também permitiu a identificação do efeito escada negativo, constituindo um índice eficiente para análises que envolvam caracterização da função contrátil.

b. A taxa de contração (TC) e a taxa inicial de relaxamento (TIR), apesar da simplicidade de seu cálculo, foram eficazes em indicar o comprometimento no processo contrátil nas tiras expostas à rianodina no experimento de efeito do tempo, o que não foi possível verificar diretamente através do tempo para o pico de tensão (TPT). A utilização de valores absolutos de TPT e tempo para metade do relaxamento (THR) parece ser capaz de indicar diferenças agudas, enquanto a TC e TIR não estão condicionadas a tais efeitos, tornando-as válidas para indicar a eficiência dos processos.

c. As taxas máxima de contração (TMC), máxima de relaxamento (TMR), média contração (TMedC) e média de relaxamento (TMedR) foram capazes de indicar uma menor sensibilidade do desenvolvimento de tensão e relaxamento às elevações na frequência do que o indicado pelos valores de TPT e THR, o que representa maior capacidade para a elevação da frequência pelo miocárdio da espécie sem o comprometimento da função cardíaca.

d. As taxas TMC, TMR, TMedC e TMedR também foram capazes de mostrar o evidente prejuízo da eficiência do processo contrátil causado pela exposição à rianodina nas diferentes frequências, o que não pôde ser percebido pelos valores de TPT e THR.

e. A utilização das taxas baseadas na maior e menor derivadas, TMC e TMR, mostraram maior sensibilidade do processo contrátil à elevação da frequência, enquanto TMedC e TMedR baseadas no conjunto de variações nas taxas instantâneas de contração mostraram-se menos sensíveis e mais coerentes com a existência de uma reserva de desempenho em frequências supra-fisiológicas, o que sugere uma superestimação com o uso das taxas baseadas nas derivadas maior e menor.

f. A capacidade de bombeamento cardíaco (CBC) demonstrou que a faixa de frequências ótimas para o trabalho ventricular da espécie é estreita e compreende a frequência de contração fisiológica, sugerindo que o miocárdio da espécie trabalhe próximo ao limite fisiológico, o que implicaria na limitação em lançar mão de ajustes cronotrópicos.

g. A integral da tensão isométrica (ITI) e a integral da tensão isométrica por minuto (ITIPM) indicaram um comprometimento mais precoce para o desenvolvimento de tensão nas elevações de frequência e uma frequência ótima para o trabalho do miocárdio em faixas inferiores ao que é observado *in vivo* para a espécie, esses resultados incoerentes com os dados da fisiologia do animal indicam que esses cálculos, por considerarem a totalidade da área sob a curva de contração, são inadequados para a avaliação da contratilidade miocárdica e que a forma como a integral da tensão foi calculada por SIEGEL; SONNENBLICK (1963) parece mais apropriada para a avaliação da contratilidade.

h. O índice de contratilidade (IC) demonstrou uma menor eficiência na produção de tensão com a elevação da frequência em comparação ao EI. No entanto, o índice de contratilidade por minuto (ICPM), a exemplo do que foi observado na literatura, aponta que, apesar do prejuízo na produção de tensão, a eficiência de contratilidade em frequências superiores à frequência de repouso é mantida, apontando para a existência de uma reserva de desempenho.

i. O ICPM e a CBC sugerem que, no miocárdio da espécie, os mecanismos de ciclagem de cálcio da sarcolema são capazes de manter seu desempenho frente a elevações na frequência e que a funcionalidade do RS é dependente da frequência.

j. A expressão das proteínas SERCA2a e PLB no ventrículo de *B. amazonicus*, com a utilização de anticorpos específicos para outras espécies, corroboram os dados farmacológicos de funcionalidade do RS e demonstra o elevado grau de conservação dessas proteínas no processo evolutivo.

k. As análises filogenéticas das proteínas exibiram alto grau de similaridade entre a SERCA2a de *D. rerio* (teleósteo) e mamíferos, corroborando o experimento de *Western Blot*, que mostrou haver especificidade entre o anticorpo anti-SERCA2a para humanos e mesma proteína do *B. amazonicus*.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, B.C.; MOMMAERTS, W.F.H.M. A study of inotropic mechanisms in the papillary muscle preparation. **J. Gen. Physiol.**, v. 42, p. 533–551, 1958.

AHO, E.; VORNANEN, M. Contractile properties of atrial and ventricular myocardium of the heart of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effects of thermal acclimation. **J. Exp. Biol.**, v. 202, p. 2663–2677, 1999.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4th ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 1396 p.

ANELLI Jr., L.C. et al. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from the neotropical teleost *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887 – Teleostei, Serrasalminidae). **J. Therm. Biol.**, v. 29, p. 103–113, 2004.

BARTON, N.H. et al. **Evolution**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. 833 p.

BERS, D.M. Ca<sup>2+</sup> regulation in cardiac muscle. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 23, p. 1157–1162, 1991.

BERS, D.M. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. **Circ Res.**, v. 87, p. 275–281, 2000.

BERS, D.M. **Excitation–contraction coupling and cardiac contractile force**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 426 p.

BERS, D.M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature.**, v. 415, p. 198–205, 2002.

BERS, D.M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 70, p. 23–49, 2008.

BOSE, D. et al. Scattered light intensity fluctuation in the canine ventricular myocardium: correlation with inotropic drug effect. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 66, p. 1232–1238, 1988.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **An. Biochem.**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAUNWALD, E. et al. Studies on Starling 's law of the heart. III. Observations in patients with mitral stenosis and atrial fibrillation on the relationships between left ventricular end diastolic segment length, filling pressure, and the characteristics of ventricular contraction. **J. Clin. Invest.**, v. 39, p. 1874–1884, 1960.

CASTILHO, P.C. et al. Elevated Ca<sup>(2+)</sup> ATPase (SERCA2) activity in tuna hearts: comparative aspects of temperature dependence. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 148, p. 124–132, 2007.

CELICHOWSKI, J.; BICHLER, E. The time course of the last contractions during incompletely fused tetani of motor units in rat skeletal muscle. **Acta Neurobiol. Exp.**, v. 62, p. 7–17, 2002.

CHAPMAN, R.A. Control of cardiac contractility at the cellular level. **Am. J. Physiol.**, v. 245, p. H535–H552, 1983.

CHATTIPAKORN, N. et al. Calcium channels and iron uptake into the heart. **World J. Cardiol.**, v. 3, p. 215-218, 2011.

COSTA, M.J. et al. Cardiac tissue function of the teleost fish *Oreochromis niloticus* under different thermal condition. **J. Therm. Biol.**, v. 25, p. 373–379, 2000.

COSTA, M.J. et al. Role of the sarcoplasmic reticulum in calcium dynamics of the ventricular myocardium of *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi) at different temperatures. **J. Therm. Biol.**, v. 29, p. 81–89, 2004.

COSTA, M.J. et al. Influence of temperature on calcium sensitivity in the ventricular myocardium of South American lungfish: Effects of extracellular calcium and adrenaline. **J. Therm. Biol.**, v. 30, p. 259–266, 2005

COSTA, M. J. et al. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup®. **Ecotoxicology.**, v. 17, p. 153–163, 2008.

COSTA, M.J.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Differences in Ca<sup>2+</sup>–management between the ventricle of two species of neotropical teleosts: the jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Spix & Agassiz, 1829), and the acara, *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824). **Neotrop. Ichthyol.**, v. 7, p. 471–478, 2009.

COYNE, M.D. et al. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium form rainbow trout. **Am. J. Physiol.**, v. 278, p. R1535–R1544, 2000.

CURI, R.; PROCÓPIO, J. **Fisiologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2009, 980 p.

DI MAIO, A.; BLOCK, B.A. Ultrastructure of the sarcoplasmic reticulum in cardiac myocytes from Pacific bluefin tuna. **Cell Tissue Res.**, v. 334, p. 121–134, 2008.

DRIEDZIC, W.R. Cardiac energy metabolism. In: HOAR, W.S. et al. **Fish Physiology**. San Diego: Academic Press, 1992. v. 12A.

DRIEDZIC, W.R.; GESSER, H. Ca<sup>2+</sup> protection from the negative inotropic effect of contraction frequency on teleost hearts. **J. Comp. Physiol.**, v. 156B, p. 135–142, 1985.

DRIEDZIC, W.R., GESSER, H. Differences in force–frequency relationships and calcium dependency between elasmobranch and teleost hearts. **J. Exp. Biol.**, v. 140, p. 227–242, 1988.

DRIEDZIC, W.R.; GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: Hypoxia, acidosis and low temperature. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 221–258, 1994.

EL-SAYED, M.F.; GESSER H. Sarcoplasmic reticulum, potassium, and cardiac force in rainbow trout and plaice. **Am. J. Phys.**, v. 257, p. R599–604, 1989.

ENDO, M. Force–frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 500, p. 73–86, 2004.

FABIATO, A. Calcium–induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **Am. J. Physiol.**, v. 245, p. C1–C14, 1983.

FARRELL, A.P.; JONES, D.R. The Heart In: HOAR, W.S. et al. **Fish Physiology**. San Diego: Academic Press, 1992, v. 12A.

FRANK, M.J.; LEVINSON, G.E. An index of the contractile state of the myocardium in man. **J. Clin. Invest.**, v. 47, p. 1615–1626, 1968.

FROESE, R., PAULY, D. (Ed.). **FishBase**: World Web Electronic Publication 1990–2008. Disponível em: <[www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)>. Acesso em: nov. 2011.

GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J.M. **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa: Humana Press, 2005.

GESSER, H. The effect of hypoxia and reoxygenation of force development in myocardia of carp and rainbow trout: protective effects of CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub>. **J. Exp. Biol.**, v. 69, p. 199–206, 1977.

GESSER, H. Mechanical performance and glycolytic requirement in trout ventricular muscle. **J. Exp. Zool.**, v. 293, p. 360–367, 2002.

GESSER, H.; JORGENSEN, E. pHi, contractility and Ca–balance under hypercapnic acidosis in the myocardium of different vertebrate species. **J. Exp. Biol.**, v. 96, p. 405–412, 1982.

GESSER, H.; POUPA, O. The role of intracellular Ca<sup>2+</sup> under hypercapnic acidosis of cardiac muscle: comparative aspects. **J. Comp. Physiol.**, v. 137, p. 307–313, 1978.

GESSER, H.; POUPA, O. Acidosis and cardiac muscle contractility: comparative aspects. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 76, p. 559–566, 1983.

GIBBS, C. L. et al. Energetics of cardiac contractions. **J. Physiol.**, v. 191, p. 25–46, 1967.

GOMES, L.C., URBINATI, E.C. Matrinxã (*Brycon amazonicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2005.

GRAHAM, J.B.; DICKSON, K.A. Tuna comparative physiology. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 4015–4024, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1264p.

HALL, T.A. Bioedit: a user–friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nuc. Ac. Symp. Series.**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HARTMUND, T.; GESSER, H. Cardiac force and high-energy phosphates under metabolic inhibition in four ectothermic vertebrates. **Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.**, v. 271, p. R946–R954, 1996.

HICKMAN, C.L.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Integrated Principles Of Zoology**. 11. ed. New York: McGraw Hill, 2001. 928 p.

HIGGINS D.G.; SHARP P.M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. **Gene**, v. 1, p. 237–244, 1988.

HILL, A. V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. **Proc. Roy. Soc. B.**, v. 126, p. 136–195, 1938.

HOVE–MADSEN, L. The influence of temperature on ryanodine sensitivity and force–frequency relationship in the myocardium of rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, v. 167, p. 47–60, 1992.

HOVE–MADSEN, L.; GESSER, H. Force–frequency relation in the myocardium of rainbow trout: effects of K<sup>+</sup> and adrenaline. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 159, p. 61–69, 1989.

HOWES, G. J. Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). **Bull. Braz. Mus. Nat. Hist. Zool.**, v. 43, p. 1–47, 1982.

HUXLEY, A. F. Mechanics and models of the myosin motor. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.**, v. 355, p. 433–440, 2000.

KEEN, J. E. et al. Cardiac physiology in tunas II. Effect of ryanodine, calcium, and adrenaline on force–frequency relationship in atrial strips from skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. **Can. J. Zool.**, v. 70, p. 1211–1217, 1992.

KEEN, J. E. et al. Effect of temperature and temperature acclimation on the ryanodine sensitivity of the trout myocardium. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 164, p. 438–443, 1994.

KIMURA M. **The neutral theory of molecular evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 384 p.

KNOWLTON, F. P.; STARLING, E. H. The influence of variations in temperature and blood–pressure on the performance of the isolated mammalian heart. **J. Physiol.**, v. 44, p. 206–216, 1912.

KUMAR, S. et al. MEGA: A biologist–centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Brief. Bioinf.**, v. 9, p. 299–306, 2008.

LABORATÓRIO DE ELETROFORESE DE PROTEÍNAS (2011) **Protein Electrophoresis Lab Protocol**. Disponível em: <<http://www.uwsp.edu/chemistry/jlawrenc/Content/Chem%20260%20Content/Chem%20260%20Labs/Protein%20Electrophoresis%20Lab%20Protocol%20web%20page.mht>>. Acesso em: 18 jan. 2011.

LANDEIRA–FERNANDEZ, A.M. et al. Temperature dependence of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2) in the ventricles of tuna and mackerel. **Am. J. Physiol.**, v. 286, p. R398–R404, 2004.

LAYLAND, J.; YOUNG, I.S.; ALTRINGHAM, J.D. The effect of cycle frequency on the power output of rat papillary muscles *in vitro*. **J. Exp. Biol.**, v. 198, p. 1035–1043, 1995.

LAYLAND, J.; KENTISH, J.C. Effects of  $\alpha$ 1– or  $\beta$ –adrenoceptor stimulation on work–loop and isometric contractions of isolated rat cardiac trabeculae. **J. Physiol.**, v. 524, p. 205–219, 2000.

LESK A.M. **Introduction to bioinformatics**, 3. ed New York: Oxford University Press, 2008. 474 p.

LIMA, F.C.T. Subfamily Bryconidae. *In*: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, S.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**. 5 ed. New York: W. H. Freeman & Co., 2003. 973 p.

LOPERA–BARRERO, N.M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: a model for species threatened with extinction. **Cien. Inv. Agr.**, v. 36, p. 191–208, 2009.

LORY, P.; BIDAUD, I.; CHEMIN, J. T-type calcium channels in differentiation and proliferation. **Cell Calcium.**, v. 40, p. 136-140, 2006.

LUND, O. et al. **Immunological Bioinformatics**. Cambridge: The MIT Press, 2005. 296 p.

MANNUZU, L.M.; MORONE, M.M.; ISACOFF, E.Y. Direct Physical Measure of Conformational Rearrangement Underlying Potassium Channel Gating. **Science.**, v. 271, p. 213-216, 1996.

MATIKAINEN, N.; VORNANEN, M. Effect of season and temperature acclimation on the function of crucian carp (*Carassius carassius*) heart. **J. Exp. Biol.**, v. 167, p. 203–220, 1992.

MITSUI, T.; OHSHIMA, H. Remarks on Muscle Contraction Mechanism. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 9, p. 872-904, 2008.

NECKÁR, J. et al. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC–delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 288, p. H1566–H1572, 2005.

NEI, M., KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000. 333 p.

OFFER, G.; RANATUNGA, K.W. Crossbridge and filament compliance in muscle: implications for tension generation and lever arm swing. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v. 31, p. 245-265, 2010.

OLLE, C.D. **Efeito do inseticida organofosforado metilparation sobre a função cardio–respiratória do peixe teleósteo matrinxã, *Brycon cephalus*.**, 2007 110 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós–Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos., 2007.

PELOUCH, V.; VORNANEN, M. Effects of thermal acclimation on ventricle size, protein composition and contractile properties of crucian carp heart. **J. Therm. Biol.**, v. 21, p. 1–9, 1996.

PETERSON, M.B.; LESCH, M. Protein synthesis and amino acid transport in isolated rabbit right ventricular muscle. **Circ. Res.**, v. 31, p. 317–327, 1972.

RANTIN, F.T. et al. Heart performance, Ca<sup>2+</sup> regulation and energy metabolism at high temperatures in *Bathygobius soporator*, a tropical marine teleost. **J. Therm. Biol.**, v. 23, p. 31–39, 1998.

REIS, R.; LIMA, F. *Brycon amazonicus*. In: **IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2010.4. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)> Acesso em: 23 jan. 2011.

RIVAROLI, L. **Respostas cronotrópicas e inotrópicas do miocárdio ventricular de três espécies de peixes tropicais ecologicamente distintas**: curimatã, *Prochilodus lineatus*, traíra, *Hoplias malabaricus*, e cascudo, *Hypostomus regani*. 2002. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

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). **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 145, p. 322–327, 2006.

ROCHA M.L.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Effects of temperature and calcium availability on cardiac contractility in *Synbranchus marmoratus*, a neotropical teleost. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 146, p. 544–550, 2006.

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 *Synbranchus marmoratus* under different thermal conditions. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 177, p. 713–721, 2007.

SALAMEH, A.; DHEIN, S. Adrenergic control of cardiac gap junction function and expression. **Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.**, v. 383, p. 331–346, 2011.

SCHLOTTHAUER, K. et al. Frequency-dependent changes in contribution of SR  $Ca^{2+}$  to  $Ca^{2+}$  transients in failing human myocardium assessed with ryanodine. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 30, p. 1285–1294, 1998.

SHATTOCK, M. J.; BERS, D. M. Inotropic response to hypothermia and the temperature-dependence of ryanodine action in isolated rabbit and rat ventricular muscle: implications for excitation-contraction coupling. **Circ. Res.**, v. 61, p. 761–771, 1987.

SHIELS, H.A. et al. The sarcoplasmic reticulum plays a major role in isometric contraction in atrial muscle of yellowfin tuna. **J. Exp. Biol.**, v. 202, p. 881–890, 1999.

SHIELS, H.A.; VORNANEN, M.; FARRELL, A. The force–frequency relationship in fish hearts – a review. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 132, p. 811–826, 2002.

SHIELS, H.A.; FARRELL, A.P. The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing  $Ca^{2+}$  to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, v. 200, p. 1607–1621, 1997.

SHIELS, H.A.; FARRELL, A.P. The effect of ryanodine on isometric tension development in isolated ventricular trabeculae from pacific mackerel (*Scomber japonicus*). **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 125, p. 331–341, 2000.

SIEGEL, J.H.; SONNENBLICK, E.H. Isometric time tension relationships as an index of myocardial contractility. **Circ. Res.**, v. 12, p. 597–610, 1963.

SONNENBLICK, E.H. Force–velocity relations in mammalian heart muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 202, p. 931–939, 1962a.

SONNENBLICK, E.H. Implications of muscle mechanics in the heart. **Federation Proc.**, v. 21, p. 975–990, 1962b.

TAMURA, K. ET al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, p. 1596–1599, 2007.

THOMAZ, J.M. et al. Cardio–respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 72, p. 1413–1424, 2009.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nuc. Ac. Res.**, v. 22; p. 4673–4680, 1994.

TIBBITS, G.F.; PHILLIPSON, K.; KASHIHARA, H. Characterization of myocardial  $Na^{+}$ – $Ca^{2+}$  exchange in rainbow trout. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. C411–C417, 1992.

TIITU, V.; VORNANEN, M. Regulation of cardiac contractility in a cold stenothermal fish, the burbot *Lota lota* L. **J. Exp. Biol.**, v. 205, p. 1597–1606, 2002.

TOTA, B.; GATTUSO, A. Heart ventricle pump in teleost and elasmobranchs: a morphodynamic approach. **J. Exp. Zool.**, v. 275, p. 162–171, 1996.

TOTA, B. et al. Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranchs and teleost fishes. **Am. J. Anat.**, v. 167, p. 15–32, 1983.

UMETSU, M. et al. Protein–protein interactions and selection: generation of molecule–binding proteins on the basis of tertiary structural information. **FEBS J.**, v. 277, p. 2006–2014, 2010.

VANGHELUWE, P. et al. New perspectives on the role of SERCA2's  $\text{Ca}^{2+}$  affinity in cardiac function. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1763, p. 1216–1228, 2006.

VORNANEN, M. Regulation of contractility of the fish (*Carassius carassius L.*) heart ventricle. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 94, p. 477–483, 1989.

VORNANEN, M. Effect of extracellular calcium on the contractility of warm- and cold-acclimated crucian carp heart. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 165, p. 507–517, 1996.

VORNANEN, M. Sarcolemmal Ca influx through L–type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. R1432–R1440, 1997.

VORNANEN, M.; SHIELS, H.; FARRELL, A.P. Plasticity of excitation–contraction coupling in fish cardiac myocytes. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 132, p. 827–846, 2002.

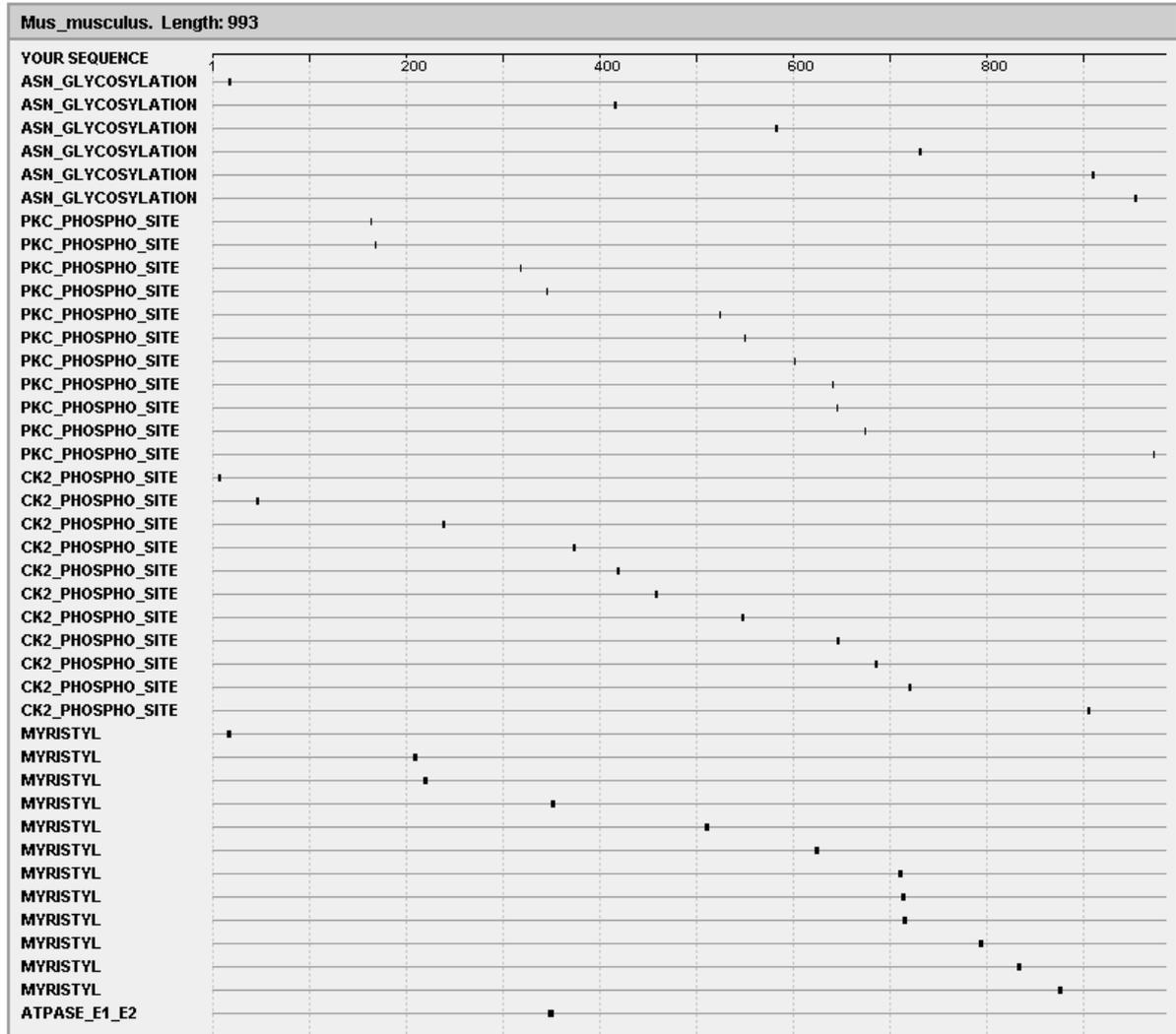
WAI–HOE, L. et al. SDS–PAGE–based quantitative assay for screening of kidney stone disease. **Biol. Proc. online.**, v. 11, p. 145–160, 2009.

WIER, W.G. Cytoplasmic  $[\text{Ca}^{2+}]$  in mammalian ventricle: Dynamic control by cellular processes. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 52, p. 467–485, 1990.

YUE, D.T. Intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$  related to rate of force development in twitch contraction of heart. **Am. J. Physiol.** v. 252, p. H760–H770, 1987.

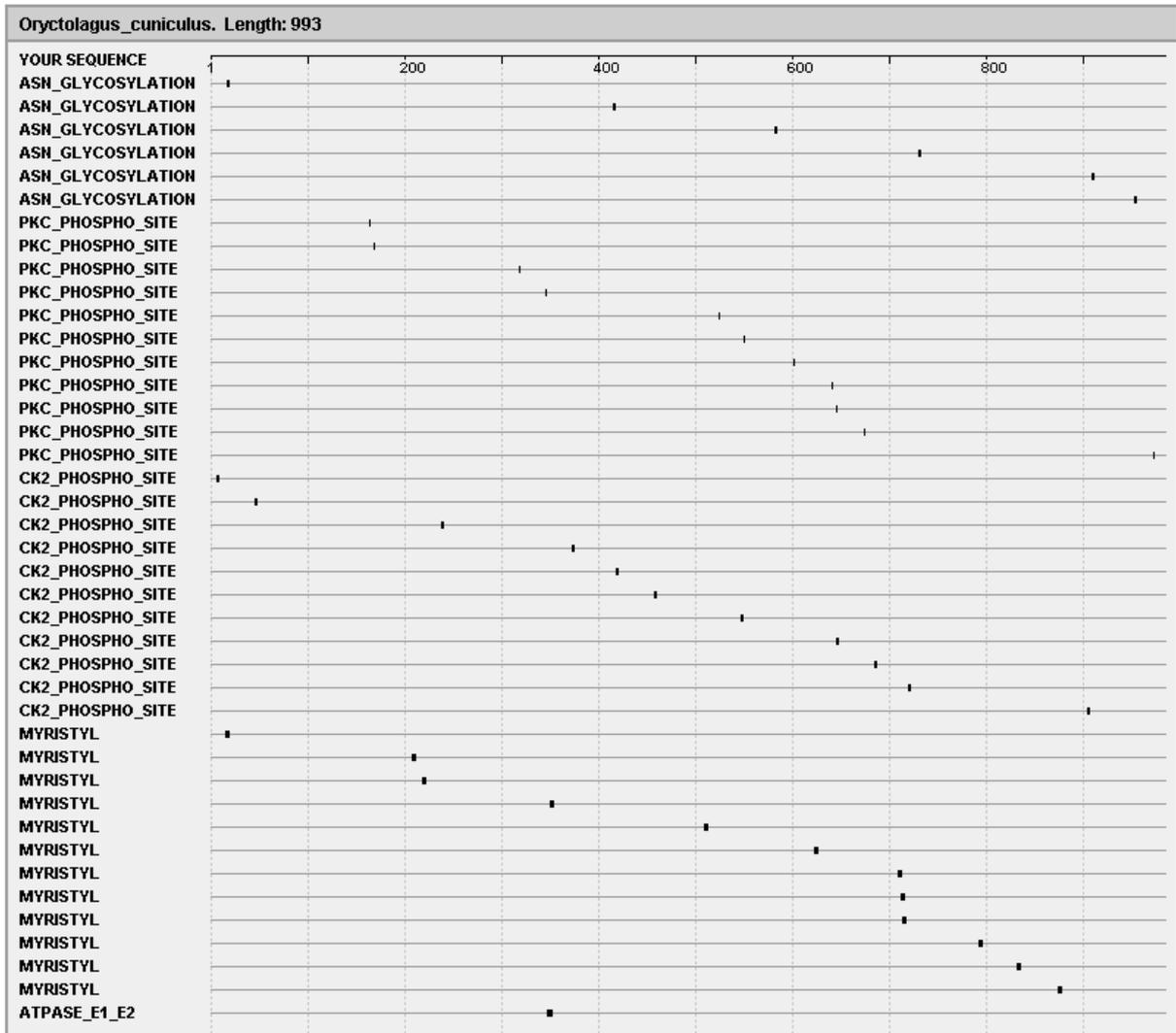
## 7. APÊNDICES

**Apêndice 1a.** Diagrama esquemático dos sítios ativos identificados na análise das sequências de SERCA2a em *M. musculus*. Os pontos pretos indicam a localização dos sítios ativos envolvidos com as diferentes funções desempenhadas pela SERCA2a.



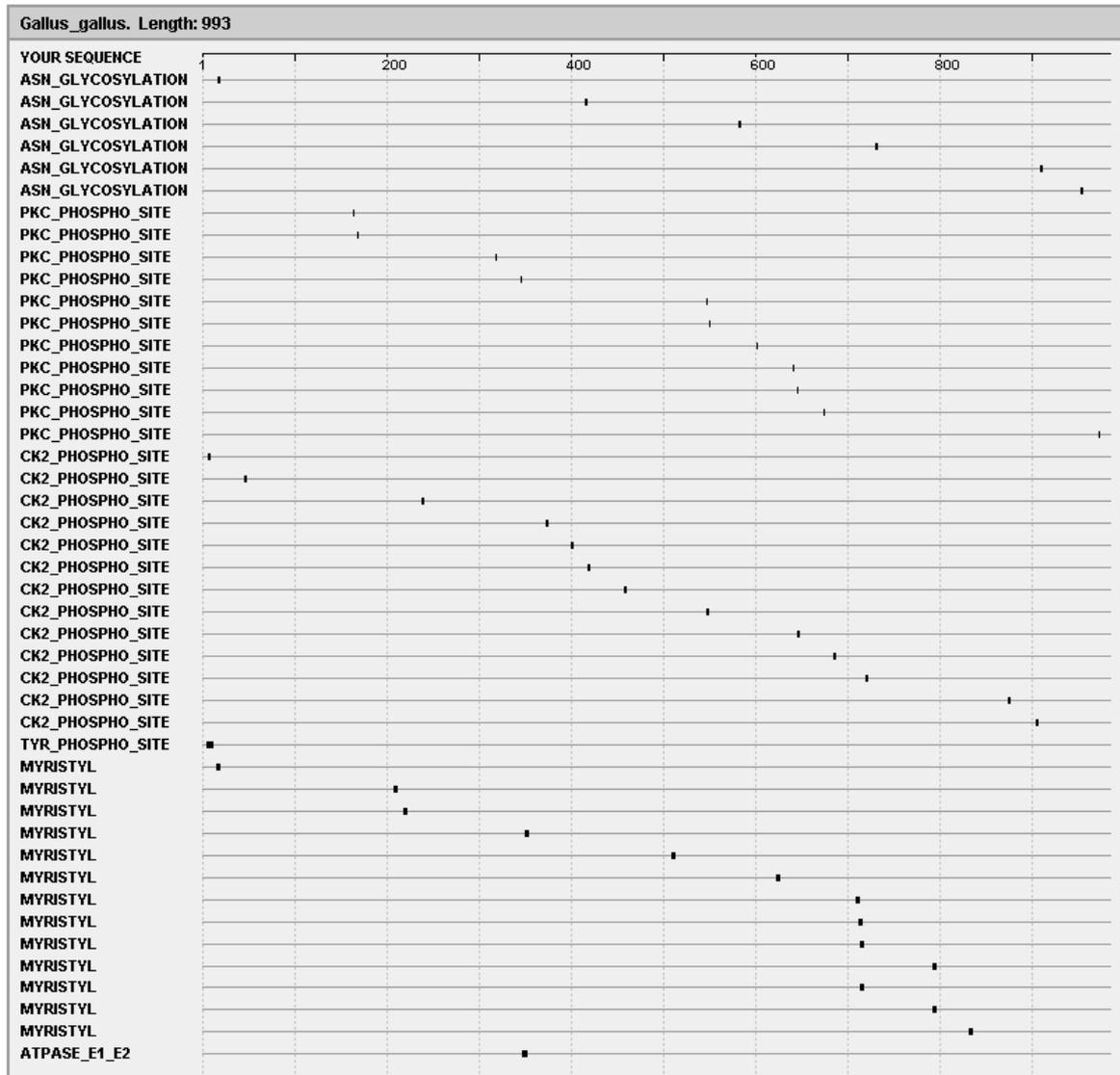
Fonte: RIVAROLI, L.

**Apêndice 1b.** Diagrama esquemático dos sítios ativos identificados na análise das sequências de SERCA2a em *O. cuniculus*. Os pontos pretos indicam a localização dos sítios ativos envolvidos com as diferentes funções desempenhadas pela SERCA2a.



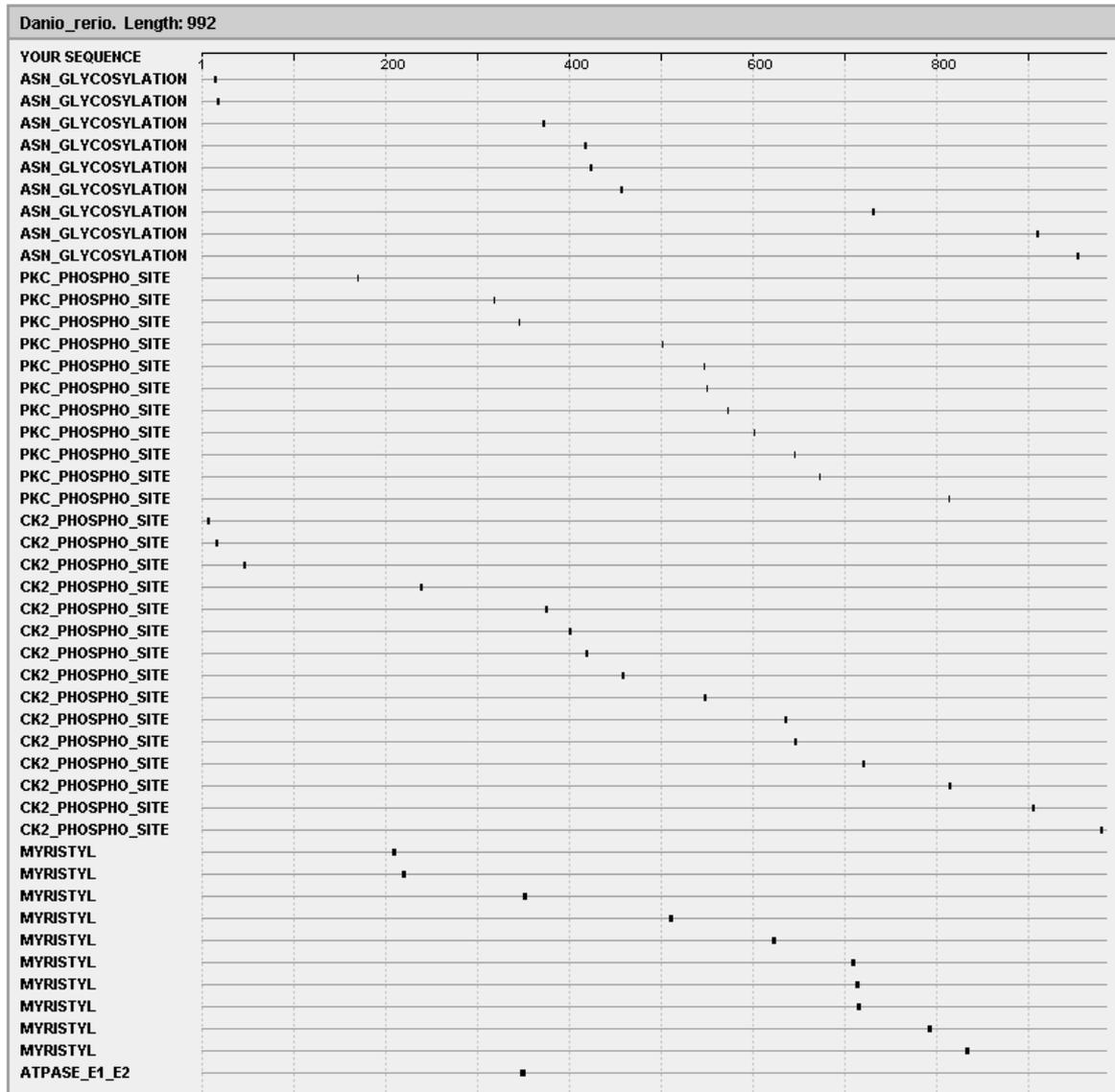
Fonte: RIVAROLI, L.

**Apêndice 1c.** Diagrama esquemático dos sítios ativos identificados na análise das sequências de SERCA2a em *G. gallus*. Os pontos pretos indicam a localização dos sítios ativos envolvidos com as diferentes funções desempenhadas pela SERCA2a.



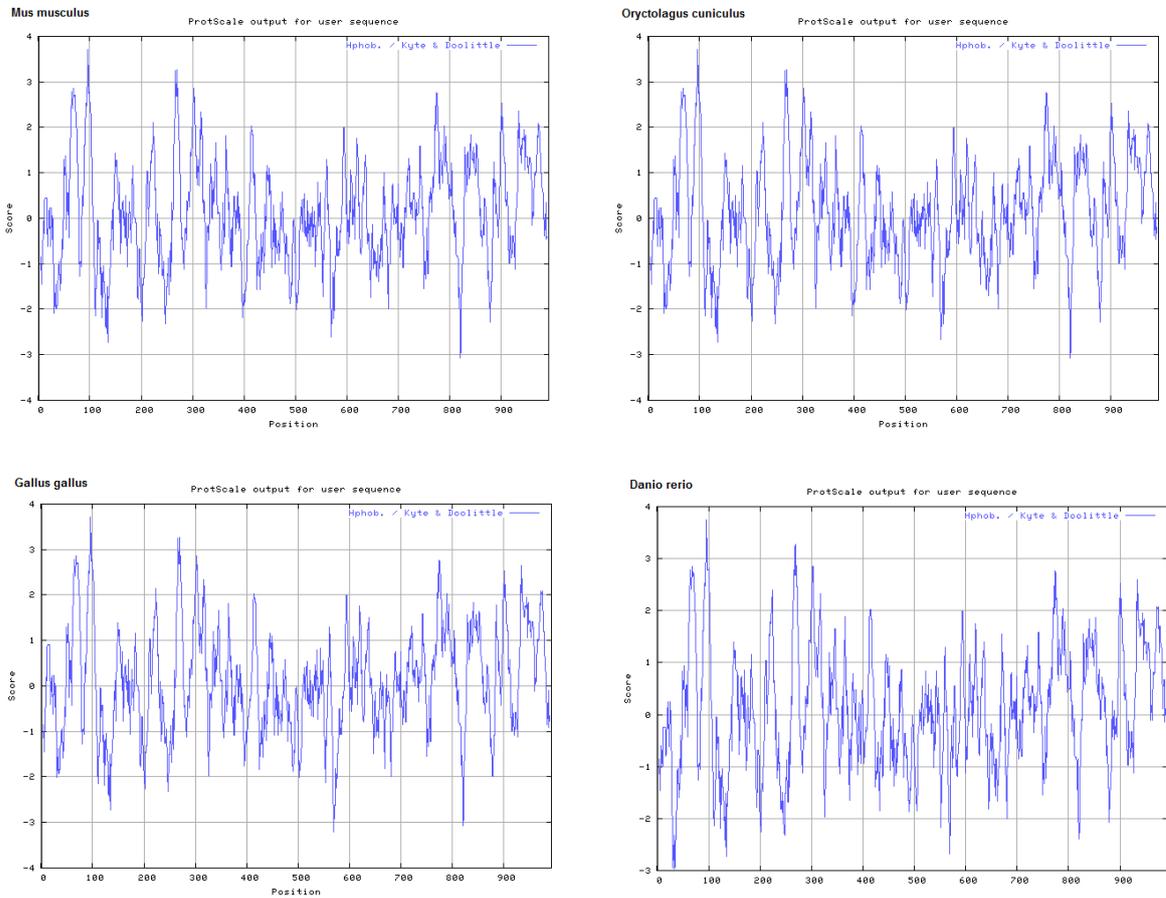
Fonte: RIVAROLI, L.

**Apêndice 1d.** Diagrama esquemático dos sítios ativos identificados na análise das sequências de SERCA2a em *D. rerio*. Os pontos pretos indicam a localização dos sítios ativos envolvidos com as diferentes funções desempenhadas pela SERCA2a.



Fonte: RIVAROLI, L.

**Apêndice 2.** Gráfico representando os níveis de hidrofobicidade e hidrofiliidade da proteína SERCA 2a em mamíferos (*M. musculus*, *O. caniculus*), aves (*G. gallus*) e teleósteo (*D. rerio*). Os dados foram obtidos utilizando o programa ProtScale (<http://expasy.org/tools/protscale.html>) (GASTEIGER *et al.*, 2005).



Fonte: RIVAROLI, L.

**Apêndice 3.** Composição química observada nas sequências de aminoácidos da SERCA2a em mamíferos (*M. musculus*, *O. caniculus*), aves (*G. gallus*) e teleosteo (*D. rerio*). Os dados foram gerados utilizando o programa ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) (GASTEIGER *et al.*, 2005).

<i>Mus musculus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Danio rerio</i>
Number of amino acids: 993	Number of amino acids: 993	Number of amino acids: 993	Number of amino acids: 992
Molecular weight: 109229.5	Molecular weight: 109217.6	Molecular weight: 109322.6	Molecular weight: 109119.1
Theoretical pI: 5.29	Theoretical pI: 5.39	Theoretical pI: 5.29	Theoretical pI: 5.13
Amino acid composition:	Amino acid composition:	Amino acid composition:	Amino acid composition:
Ala (A) 81 8.2%	Ala (A) 84 8.5%	Ala (A) 83 8.4%	Ala (A) 87 8.8%
Arg (R) 41 4.1%	Arg (R) 42 4.2%	Arg (R) 42 4.2%	Arg (R) 46 4.6%
Asn (N) 42 4.2%	Asn (N) 43 4.3%	Asn (N) 44 4.4%	Asn (N) 41 4.1%
Asp (D) 47 4.7%	Asp (D) 46 4.6%	Asp (D) 47 4.7%	Asp (D) 54 5.4%
Cys (C) 26 2.6%			
Gln (Q) 28 2.8%	Gln (Q) 26 2.6%	Gln (Q) 25 2.5%	Gln (Q) 25 2.5%
Glu (E) 74 7.5%	Glu (E) 74 7.5%	Glu (E) 74 7.5%	Glu (E) 70 7.1%
Gly (G) 64 6.4%	Gly (G) 64 6.4%	Gly (G) 62 6.2%	Gly (G) 60 6.0%
His (H) 12 1.2%	His (H) 13 1.3%	His (H) 12 1.2%	His (H) 11 1.1%
Ile (I) 73 7.4%	Ile (I) 73 7.4%	Ile (I) 75 7.6%	Ile (I) 75 7.6%
Leu (L) 94 9.5%	Leu (L) 93 9.4%	Leu (L) 92 9.3%	Leu (L) 89 9.0%
Lys (K) 58 5.8%	Lys (K) 58 5.8%	Lys (K) 57 5.7%	Lys (K) 52 5.2%
Met (M) 30 3.0%	Met (M) 30 3.0%	Met (M) 30 3.0%	Met (M) 29 2.9%
Phe (F) 39 3.9%	Phe (F) 39 3.9%	Phe (F) 38 3.8%	Phe (F) 39 3.9%
Pro (P) 45 4.5%	Pro (P) 45 4.5%	Pro (P) 44 4.4%	Pro (P) 44 4.4%
Ser (S) 62 6.2%	Ser (S) 58 5.8%	Ser (S) 61 6.1%	Ser (S) 64 6.5%
Thr (T) 61 6.1%	Thr (T) 62 6.2%	Thr (T) 61 6.1%	Thr (T) 58 5.8%
Trp (W) 13 1.3%			
Tyr (Y) 18 1.8%	Tyr (Y) 18 1.8%	Tyr (Y) 20 2.0%	Tyr (Y) 20 2.0%
Val (V) 85 8.6%	Val (V) 86 8.7%	Val (V) 87 8.8%	Val (V) 89 9.0%
Pyl (O) 0 0.0%			
Sec (U) 0 0.0%			
(B) 0 0.0%	(B) 0 0.0%	(B) 0 0.0%	(B) 0 0.0%
(Z) 0 0.0%	(Z) 0 0.0%	(Z) 0 0.0%	(Z) 0 0.0%
(X) 0 0.0%	(X) 0 0.0%	(X) 0 0.0%	(X) 0 0.0%
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 121	Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 120	Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 121	Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 124
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 99	Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 100	Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 99	Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 98

Fonte: RIVAROLI, L.