

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**MANEJO DO CÁLCIO INTRACELULAR E INFLUÊNCIA  
DA TEMPERATURA SOBRE A CONTRATILIDADE  
CARDÍACA DE *Synbranchus marmoratus***

**MATHEUS LAVORENTI ROCHA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

**São Carlos – SP**  
**2004**

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

R672mc

Rocha, Matheus Lavorenti.

Manejo do cálcio intracelular e influência da temperatura sobre a contratilidade cardíaca de *Synbranchus marmoratus* / Matheus Lavorenti Rocha. -- São Carlos : UFSCar, 2004. 102 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Fisiologia comparada. 2. Reticulo sarcoplasmático. 3. Acoplamento E-C. 4. Temperatura. 5. Relação força-frequência I. Título.

CDD: 591.1(20<sup>a</sup>)

**ORIENTADORA**

---

**Profª. Dra. Ana Lúcia Kalinin**

*Pelos valores que me ensinaram, todas as conquistas da minha vida sempre serão dedicadas aos meus pais, Luiz Carlos e Regina.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Profª. Dra. Ana Lúcia Kalinin, pela oportunidade de realização desse trabalho, e muito além disto, pela conduta profissional, dedicada orientação, confiança e amizade.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite, pela análise do trabalho e grande colaboração.

Aos amigos Mônica e Cláudio, pela fundamental contribuição desde o início dos experimentos até os dias de hoje.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

À Universidade Federal de São Carlos, pela estrutura e condições proporcionadas.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À amiga Profª. Dra. Luciane Cruz Lopes, que sempre receberá meus agradecimentos e respeito.

Todos os colegas do laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa, pela amizade e convivência todos esses dias.

Às minhas irmãs, Rachel, Marina e Maira, pelo carinho, apoio e incentivo sem o qual este trabalho não teria real valor.

Ao corpo docente e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, em particular, pela memória do Sr. Nelson A. Matos, que nos deixou sem mesmo saber dos sinceros agradecimentos que eu tinha por ele.

Às estagiárias do laboratório, Camila e Cris, pelas risadas e por tornarem os dias de experimentos menos cansativos.

A todos aqueles que, apesar de não citados, tiveram muita importância e ajudaram de alguma forma que este trabalho pudesse ser concluído.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	

### **1. INTRODUÇÃO**..... x

1.1. Íons Ca <sup>2+</sup> e Acoplamento Excitação-Contração Cardíaco.....	x
----------------------------------------------------------------------------	---

### **2. OBJETIVOS**..... x

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**..... x

3.1. Material.....	xx
3.1.1. Posição Sistemática das Espécies.....	xx
3.1.2. Breves Considerações Sobre a Espécie Estudada.....	xx
3.2. Métodos.....	xx
3.2.1. Coleta e Manutenção em Laboratório.....	xx
3.2.2. Preparações Experimentais.....	xx
3.2.2.1. Experimentos <i>In Vivo</i> .....	xx
3.2.2.2. Experimentos <i>In Vitro</i> .....	xx
3.2.3. Protocolos Experimentais.....	xx
3.2.3.1. Experimentos <i>In Vivo</i> .....	xx
3.2.3.1.1. Redução da Temperatura.....	xx
3.2.3.1.2. Aumento da Temperatura.....	xx
3.2.3.2. Experimentos <i>In Vitro</i> .....	xx
3.2.3.2.1. Efeito do Tempo.....	xx
3.2.3.2.2. Efeito do Aumento da Concentração de Cálcio.....	xx
3.2.3.2.3. Tensão Pós-Repouso.....	xx
3.2.3.2.4. Relação Força-Freqüência.....	xx
3.2.3.2.4.1. Preparações Controle.....	xx
3.2.3.2.4.2. Baixa Concentração de Adrenalina (10 <sup>-8</sup> M).....	xx
3.2.3.2.4.3. Baixa Concentração de Adrenalina + Rianodina.....	xx
3.2.3.2.4.4. Rianodia + Alta concentração de Adrenalina (10 <sup>-5</sup> M).....	xx
3.3. ANÁLISE DOS DADOS.....	xx
3.3.1. Forma de Apresentação dos Resultados.....	xx
3.3.2. Tratamento Estatístico dos Dados.....	xx

### **4. RESULTADOS**..... xx

4.1. Freqüência cardíaca <i>in vivo</i> .....	xx
4.1.1. Efeito do Aumento da Temperatura e Retorno a 25 °C.....	xx
4.1.2. Efeito da Diminuição da Temperatura e Retorno a 25 °C.....	xx

4.2. Músculo Cardíaco Isolado.....	XX
4.2.1. Efeito do Tempo sobre a Força de Contração.....	XX
4.2.2. Aumento Progressivo na Concentração de Cálcio Extracelular.....	XX
4.2.2.1. Efeito do aumento progressivo do cálcio extracelular a 15 °C.....	XX
4.2.2.2. Efeito do aumento progressivo do cálcio extracelular a 25 °C.....	XX
4.2.2.3. Efeito do aumento progressivo do cálcio extracelular a 35 °C.....	XX
4.2.2.4. Comparações entre 15 x 25 x 35 °C.....	XX
4.2.3. Tensão (Fc) pós-reposo com e sem rianodina.....	XX
4.2.4. Efeitos de Incrementos da Frequência de Estimulação.....	XX
4.2.4.1. Relação Força-Frequência à 15 °C.....	XX
4.2.4.2. Relação Força-Frequência à 25 °C.....	XX
4.2.4.3. Relação Força-Frequência à 35 °C.....	XX
4.2.4.4. Comparações entre 15 x 25 x 35 °C.....	XX
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>XX</b>
5.1. Efeito da temperatura sobre a frequência cardíaca <i>in vivo</i> .....	XX
5.2. Respostas cardíacas <i>in vitro</i> .....	XX
5.2.1. Efeito do Tempo de Exposição.....	XX
5.2.2. Aumento da disponibilidade de Ca <sup>2+</sup> extracelular.....	XX
5.2.3. Tensão pós-pausa.....	XX
5.2.4. Efeitos de Incrementos da Frequência de Estimulação.....	XX
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>X</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>X</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Exemplar adulto de muçum, *Synbranchus marmoratus*.....x
- Figura 2. Efeito da elevação gradual da temperatura de 25 para 35 °C e da recuperação subsequente a 25 °C sobre a frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) *in vivo* de *S. marmoratus* (n = 7). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais. ....xx
- Figura 3. Efeito da redução gradual da temperatura de 25 para 15 °C e da recuperação subsequente a 25 °C sobre a frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) *in vivo* de *S. marmoratus* (n = 7). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (p < 0,05). ....xx
- Figura 4. Efeito do tempo de exposição (40 min) sobre a força de contração ( $F_c$  –  $mN.mm^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C (n = 10) em meio contendo 1,25 mM de  $CaCl_2$ . As barras verticais representam os valores médios  $\pm$  1 E.P.M. ....xx
- Figura 5. Efeito de aumentos na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  (mM) sobre o desenvolvimento de força de contração ( $F_c$  –  $mN.mm^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) na temperatura de 15 °C. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.
- Figura 6. Efeito de aumentos na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  (mM) sobre os tempos de contração (TPT - ms) e relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a temperatura de 15 °C. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.
- Figura 7. Efeito de aumentos na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  (mM) sobre o desenvolvimento de força de contração ( $F_c$  –  $mN.mm^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) na temperatura de 25 °C. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.
- Figura 8. Efeito de aumentos na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  (mM) sobre os tempos de contração (TPT - ms) e relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) na temperatura de 25 °C. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. (\*) - diferenças significativas (p < 0,05) em relação aos valores iniciais.
- Figura 9. Efeito de aumentos na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  (mM) sobre o desenvolvimento de força de contração ( $F_c$  –  $mN.mm^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) na temperatura de 35 °C. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os asteriscos representam diferenças significativas (p < 0,05) em relação aos valores iniciais.
- Figura 10. Efeito de aumentos progressivos na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  (mM) sobre os tempos de contração (TPT - ms) e relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a temperatura de 35 °C. Os pontos representam os valores médios  $\pm$  1 E.P.M. (\*) - diferenças significativas (p < 0,05) em relação aos valores iniciais.
- Figura 11. Diagrama comparativo do efeito de incrementos progressivos na concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular sobre a força de contração ( $F_c$  –  $mN.mm^{-2}$ ) de tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 15, 25 e 35 °C. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas (p < 0,05) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas (p < 0,05) em relação aos valores obtidos à 25 °C.
- Figura 12. Diagrama comparativo do efeito de incrementos progressivos na concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular sobre o tempo para o pico máximo de tensão (TPT - ms) de



tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 15, 25 e 55°C. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à 25 °C.

Figura 13. Diagrama comparativo do efeito de incrementos progressivos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre o tempo para 50 % de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 15, 25 e 55°C. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à 25 °C.

Figura 14. Efeito da temperatura sobre a tensão pós-pausa (Fc - % da força desenvolvida na última contração precedente ao repouso) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* após uma pausa em preparações controle (n = 10) e tratadas com 10  $\mu\text{M}$  de rianodina (n = 10). Uma frequência de estimulação de 0,2 Hz seguida por uma pausa diastólica de 5 min. As barras verticais representam valores médios + 1 E.P.M. Asteriscos acima das barras: diferença significativa em relação aos valores pré-pausa ( $p < 0.001$ ). Asteriscos acima das linhas horizontais: diferença significativa entre os valores controle e após adição de rianodina ( $p < 0.001$ ).

Figura 15. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre a força de contração (Fc -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 15 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M.

Figura 16. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para o pico de tensão (TPT - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 15 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M.

Figura 17. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 15 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) é indicada pelo símbolos: # - BA+RIAN x AA+RIAN.

Figura 18. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre a força de contração (Fc -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 25 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: \* - BA x BA+RIAN; # - BA+RIAN x AA+RIAN.

Figura 19. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para o pico de tensão (TPT - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 25 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: # - BA+RIAN x AA+RIAN;  $\square$  - AA+RIAN x BA

- Figura 20. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 25 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: # - BA+RIAN x AA+RIAN;  $\square$  - AA+RIAN x BA
- Figura 21. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre a força de contração ( $F_c - \text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 35 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: \* - BA x BA+RIAN; # - BA+RIAN x AA+RIAN.
- Figura 22. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para o pico de tensão (TPT - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 35 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: \* - BA x BA+RIAN; # - BA+RIAN x AA+RIAN.
- Figura 23. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 35 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: # - BA+RIAN x AA+RIAN.
- Figura 24. Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre a força de contração ( $F_c - \text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo baixa concentração de adrenalina ( $10^{-8}$  M). Os pontos representam os valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à 25 °C.
- Figura 25. Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre os parâmetros tempo-dependentes A) TPT e B) THR ( ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo baixa concentração de adrenalina ( $10^{-8}$  M). Os pontos representam os valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à 25 °C.
- Figura 26. Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre a força de contração ( $F_c - \text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo baixa concentração de adrenalina ( $10^{-8}$  M) mais rianodina (10  $\mu\text{M}$ ). Os pontos representam os valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à 25 °C.

- Figura 27. Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre os parâmetros tempo-dependentes A) TPT e B) THR ( ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo baixa concentração de adrenalina ( $10^{-8}$  M) mais Rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ). Os pontos representam os valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à  $25^\circ\text{C}$ .
- Figura 28. Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre a força de contração ( $F_c - \text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo alta concentração de adrenalina ( $10^{-5}$  M) mais rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ). Os pontos representam os valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à  $25^\circ\text{C}$ .
- Figura 29. Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre os parâmetros tempo-dependentes A) TPT e B) THR ( ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo alta concentração de adrenalina ( $10^{-5}$  M) mais Rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ). Os pontos representam os valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à  $25^\circ\text{C}$ .

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores de frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) *in vivo* de *S. marmoratus* em resposta à redução de temperatura de 25 para 15 °C (n = 8) e de aumentos da temperatura de 25 para 35 °C (n = 7) e ambos após retorno subsequente para 25 °C (25r). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. (\*\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$
- Tabela 2. Valores da força de contração ( $F_c$  –  $mN.mm^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 15, 25 e 35 °C durante a exposição a um meio contendo 1,25 mM de  $CaCl_2$  durante um período de 40 minutos. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.
- Tabela 3. Valores da força de contração ( $F_c$  –  $mN.mm^{-2}$ ), do tempo de contração (TPT – ms) e do tempo para para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 15 °C. durante a elevação gradual da concentração de  $Ca^{2+}$  no meio extracelular. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.
- Tabela 4. Valores da força de contração ( $F_c$  –  $mN.mm^{-2}$ ), do tempo de contração (TPT – ms) e do tempo para para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 25 °C. durante a elevação gradual da concentração de  $Ca^{2+}$  no meio extracelular. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ .
- Tabela 5. Valores da força de contração ( $F_c$  –  $mN.mm^{-2}$ ), do tempo de contração (TPT – ms) e do tempo para para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 35 °C. durante a elevação gradual da concentração de  $Ca^{2+}$  no meio extracelular. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*);  $p < 0,01$ .
- Tabela 6. Valores da força de contração ( $F_c$  - % da última contração precedente ao repouso) após uma pausa de 5 min pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* nas diferentes temperaturas em preparações controle (n = 10) e em presença de 10  $\mu M$  de rianodina (n = 10). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.
- Tabela 7. Valores absolutos da força de contração isométrica ( $F_c$ ), do tempo para o pico máximo de força (TPT) e do tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* na frequência de estimulação de 0,2Hz nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C e tratamentos (todos n = 10): Controle (CTRL); Baixa Adrenalina (BA); Baixa Adrenalina + Rianodina (BA+RIAN); Alta Adrenalina + Rianodina (AA+RIAN). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: ‡ - CTRL x BA; ☼ - BA x BA+RIAN; \* - BA+RIAN x AA+RIAN.
- Tabela 8. Valores de força de contração ( $F_c$  –  $mN.mm^{-2}$ ) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações (n = 10): Controle (CTRL – 1,25 mM de  $Ca^{2+}$ ); Baixa Adrenalina (BA –  $10^{-8}$  M); Baixa Adrenalina + Rianodina (BA+RIAN – 10  $\mu M$ ); Alta Adrenalina + Rianodina (AA+RIAN –  $10^{-5}$  M) na temperatura de 15 °C. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.
- Tabela 9. Valores de força de contração ( $F_c$  –  $mN.mm^{-2}$ ) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR – ms)

das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações (n = 10): Controle (CTRL – 1,25 mM de Ca<sup>2+</sup>); Baixa Adrenalina (BA – 10<sup>-8</sup> M); Baixa Adrenalina + Rianodina (BA+RIAN – 10 μM); Alta Adrenalina + Rianodina (AA+RIAN – 10<sup>-5</sup> M) na temperatura de **25 °C**. Valores médios ± 1 E.P.M. Em negrito, valores diferentes significativamente (p < 0,05) dos obtidos inicialmente.

Tabela 10. Valores de força de contração (Fc – mN.mm<sup>-2</sup>) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações (n = 10): Controle (CTRL – 1,25 mM de Ca<sup>2+</sup>); Baixa Adrenalina (BA – 10<sup>-8</sup> M); Baixa Adrenalina + Rianodina (BA+RIAN – 10 μM); Alta Adrenalina + Rianodina (AA+RIAN – 10<sup>-5</sup> M) na temperatura de **35 °C**. Valores médios ± 1 E.P.M. Em negrito, valores diferentes significativamente (p < 0,05) dos obtidos inicialmente.

Tabela 11. Valores de força de contração (Fc – mN.mm<sup>-2</sup>) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações (n = 10) contendo Baixa concentração de adrenalina (BA – 10<sup>-8</sup> M) nas temperatura de 15, 25 e 35 °C. Valores médios ± 1 E.P.M.

Tabela 12. Valores de força de contração (Fc – mN.mm<sup>-2</sup>) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações (n = 10) contendo Baixa concentração de adrenalina (BA – 10<sup>-8</sup> M) mais Rianodina (10 μM) nas temperatura de 15, 25 e 35 °C. Valores médios ± 1 E.P.M.

Tabela 13. Valores de força de contração (Fc – mN.mm<sup>-2</sup>) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações (n = 10) contendo Alta concentração de adrenalina (AA – 10<sup>-5</sup> M) mais Rianodina (10 μM) nas temperatura de 15, 25 e 35 °C. Valores médios ± 1 E.P.M.

## RESUMO

O presente estudo teve por objetivo analisar as respostas *in vivo* e *in vitro* do miocárdio de muçum, *Synbranchus marmoratus*, aclimatados a 25 °C e testados a 15, 25 e 35 °C. Os registros de frequência cardíaca *in vivo* ( $f_H$  – bpm) após elevação e redução gradual da temperatura, e seu retorno subsequente a 25 °C, foram feitos através de implantes de eletrodos na região cardíaca do animal e registros eletrocardiográficos. Adicionalmente foram feitos registros *in vitro* das respostas inotrópicas ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) e dos parâmetros tempo-dependentes (TPT – tempo para o pico de força e THR – tempo para 50% do relaxamento) das tiras ventriculares estimuladas eletricamente a diferentes frequências em função da temperatura, concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , adrenalina e rianodina (bloqueadora da função do retículo sacoplasmático – RS). *In vivo*, a redução da temperatura diminuiu gradualmente a  $f_H$ , atingindo valores mínimos de  $12 \pm 0,6$  bpm a 15 °C, enquanto o aumento da temperatura elevou a  $f_H$  até  $51 \pm 2$  bpm a 35 °C. Em ambos os casos, a  $f_H$  inicialmente observada ( $\sim 31$  bpm) foi recuperada com o retorno à temperatura inicial (25 °C). Um inotropismo negativo foi observado tanto durante aumentos quanto durante reduções da temperatura do banho, sendo que o TPT e o THR variaram de maneira inversa a temperatura, aumentando quando a temperatura era reduzida e vice-versa. A adição de concentrações crescentes  $\text{Ca}^{2+}$  (de 1,25 até 11,25 mM) ao banho causou aumento da  $F_c$  somente a 35 °C, a partir de 3,25 mM, mostrando que a tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular parece ter maior importância em temperaturas elevadas. O TPT diminuiu somente em 25°C, em concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  acima de 7,25 mM. Porém o THR não se alterou a 15 e 25°C, enquanto que a 35°C ocorreu um aumento a partir de 7,25 mM. A análise da tensão pós-pausa, com e sem 10  $\mu\text{M}$  de rianodina, revelou uma significativa potenciação da força nas preparações controle a 25 °C (100 para  $119,8 \pm 4,1$  %) e 15 °C (100 para  $118,4 \pm 2,8$  %), sendo inibida pela rianodina somente em 25 °C (100 para  $97,6 \pm 1,5$ %). Em 35°C, a força permaneceu inalterada em preparações controle, e houve uma significativa queda no desenvolvimento de força após a pausa na presença rianodina (100 para  $76,6 \pm 4,6$ %). Com o aumento da frequência de estimulação, observou-se que as tiras ventriculares alcançam frequências elevadas quanto maior for a temperatura experimental. Quedas na  $F_c$  em preparações controle foram observadas somente em altas frequências (a partir de 1,2 Hz). O TPT e o THR sofreram reduções significativas quando comparados aos valores obtidos inicialmente. A adição de concentração tônica de adrenalina ( $10^{-8}$  M) não alterou significativamente a  $F_c$ , o TPT e o THR, quando comparados com preparações controle. A 25°C, o tratamento com rianodina provocou uma diminuição na  $F_c$  nas frequências entre 0,2 até 0,8 Hz (42,5 e 32 %, respectivamente). Já à 35°C, a adição de rianodina causou diminuição da  $F_c$  nas frequências de 0,2 Hz até 1,2 Hz (44 e 25 %, respectivamente). O TPT e THR não sofreram alterações significativas após adição de rianodina. A combinação entre rianodina e elevada concentração de adrenalina ( $10^{-5}$  M) mostrou que nesta situação, os cardiomiócitos são capazes de recuperarem o inotropismo negativo causado pela rianodina, indicando uma potencial participação do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da sarcolema. Neste caso, o aumento da  $F_c$  foi acompanhado por aumentos no TPT e no THR. Os dados revelaram que o  $\text{Ca}^{2+}$  responsável pela ativação dos miofilamentos deve derivar de pelo menos duas fontes: os espaços extracelulares (evidenciado pelo aumento de  $F_c$  durante incrementos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular) e uma fração significativa fornecida por fontes internas, ou seja, o RS.

## ABSTRACT

The present study analyzed the *in vivo* and *in vitro* responses of the myocardium obtained from *Synbranchus marmoratus* acclimated at 25 °C and tested at 15, 25 and 35 °C. The *in vivo* heart rate ( $f_H$  – bpm) was measured during acute transitions in temperature and subsequent return to 25 °C. ECG recordings (lead D<sub>I</sub> of the electrocardiography) were obtained of electrodes at cardiac region. Recordings of the isometric contraction force ( $F_c$  – mN.mm<sup>-2</sup>) and time-dependent parameters (TPT – time to peak tension; THR – time to half relaxation) were obtained *in vitro* from ventricle strips electrically paced in response to stimulation frequency, temperature, extracellular Ca<sup>2+</sup>, adrenaline and ryanodine (blocker of the sarcoplasmic reticulum – SR). The species showed a significant increase in the  $f_H$  during the transition from 25 to 35 °C, and a significant decrease from 25 to 15 °C, showing the importance of the chronotropic adjustments in response to thermal alterations and a great tolerance and adaptation to different thermal conditions. The species did show significant changes in the twitch force ( $F_c$ ) development by the ventricular strips during the increases and decreases of temperature. The addition of crescent Ca<sup>2+</sup> concentrations to the medium evidenced the importance of the extracellular Ca<sup>2+</sup> for the heart contraction mainly at 35 °C. Significant changes in the time-dependent parameters after increments in the Ca<sup>2+</sup> extracellular concentration were not recorded. The post rest tension was conducted with and without 10 μM ryanodine in the medium. A significant post rest potentiation was recorded for the control preparations at 25 °C (100 to 119.8 ± 4.1 %) and 15 °C (100 to 118.4 ± 2,8 %). However, this post rest potentiation was inhibited by ryanodine only at 25 °C (100 to 97.6 ± 1.5%), and, at 35 °C, force remained unchanged in the control preparations, but a significant post rest decay was recorded in the presence of ryanodine (100 to 76.6 ± 4.6%). The impact of increases in the imposed contraction frequency caused a decline of the force only at high frequencies in all the experimental temperatures. The maximal stimulation frequency sustained by the species is superior at high temperatures. The addition of a tonic level of adrenaline (10<sup>-8</sup> M) did not cause any significant alteration in force or time-dependent parameters, when compared to control values. However, in presence of the 10 μM ryanodine, the  $F_c$  decreased significantly, without alteration in the TPT and THR. Additionally, the adrenaline concentration was increased to 10<sup>-5</sup> M. The adrenergic stimulation with high level of adrenaline caused positive inotropy with a magnitude that ameliorated the negative inotropic effect of ryanodine, with the exception of high pacing frequencies. In conclusion, *S. marmoratus* seems to possess large stores of intracellular activator Ca<sup>2+</sup>, resembling mammals rather than terrestrial ectothermic vertebrates. As a difference, this species also depends on extracellular sources of Ca<sup>2+</sup> at high temperatures which provide more flexibility to modulate the contraction force.

## 1. INTRODUÇÃO

Os vertebrados inferiores exibem uma ampla diversidade de tamanhos, adaptações ecológicas, estilos de vida, além de peculiaridades metabólicas. Segundo MUÑOZ-CHÁPULI & HAMLETT (1996), tais características fazem com que a demanda imposta ao coração destes animais varie consideravelmente, resultando em uma ampla gama de modificações na morfologia e fisiologia de seus sistemas cardiovasculares. Além disso, como animais ectotérmicos, a função cardíaca se altera em sincronia com a temperatura. Durante variações sazonais de temperatura, os peixes podem aclimatizar-se à nova condição térmica ajustando seus processos bioquímicos e fisiológicos de maneira compensatória. Podem também encontrar mudanças agudas, resultantes de ciclos diurnos de temperatura ou de movimentos verticais de predação ou migração através da coluna d'água (MATTHEWS & BERG, 1997; REID et al., 1997).

A influência da temperatura sobre a taxa cardíaca, funcionalidade dos canais iônicos, potenciais fontes e transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o acoplamento excitação-contração (E-C) do músculo cardíaco são de particular interesse durante alterações na temperatura (SHIELS et al., 2002).

Visto que mudanças agudas na temperatura ambiental resultam em imediatas mudanças na temperatura corporal (BOWLER & TIRRI, 1990), e que tais mudanças não são necessariamente prejudiciais e podem ter curta duração, o efeito deste parâmetro no acoplamento E-C cardíaco pode ter importante influência, sobretudo no manejo do  $\text{Ca}^{2+}$  disponível para contração (VORNANEN et al., 2002). Desta forma, a disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  é o principal determinante na geração de força de contração (Fc) no miocárdio desses animais.

Embora o miocárdio dos teleósteos contenha basicamente todos os componentes celulares para o acoplamento E-C vistos em mamíferos, a exata interação e papel desenvolvido por cada um sobre a geração de Fc são ainda incertos. Mais particularmente, a relativa importância das fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  para ativação da contratilidade em teleósteos (fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  transarcolemal *versus* mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático) não foram claramente definidas e apresentam particularidades que variam entre as espécies. Além



disso, estudos de ultraestrutura indicaram variabilidade na estrutura e complexidade do retículo sarcoplasmático (RS) do coração de diferentes espécies de teleósteos como, por exemplo, grau de desenvolvimento, capacidade de armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$ , densidade e disposição dos canais de rianodina, subtipos e diferenciação da atividade de bombas e canais iônicos (TIITU & VORNANEN, 2003).

### 1.1. Íons $\text{Ca}^{2+}$ e Acoplamento Excitação-Contração Cardíaco

A importância dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  para o processo de contração muscular foi observada inicialmente por Ringer em 1883 (OPIE, 1992), que descreveu os efeitos da remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre o coração isolado de sapo:

“...’Quando o fluido extracelular é composto de solução salina, o ventrículo se torna cada vez mais fraco e a contratilidade cessa. Bicarbonato de cálcio, ou cloreto de cálcio em doses fisiológicas, ou em quantidades menores que aquelas presentes no sangue, restabelecem boas contrações’...”

Posteriormente, outros autores investigaram o papel do  $\text{Ca}^{2+}$  em diferentes tipos de músculo.

Levando-se em conta a provável diferença existente entre o coração de espécies endotérmicas e ectotérmicas no que concerne às contribuições relativas do fluxo de cálcio através da sarcolema e também de sua liberação e tomada pelo retículo sarcoplasmático (RS), torna-se imprescindível o conhecimento do acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C) em peixes.

De acordo com DRIEDZIC & GESSER (1994), os mecanismos contráteis, ou seja, a interação actomiosínica e sua regulação pelo cálcio, parecem ser similares nos diferentes grupos de vertebrados (BERS, 1991). Porém, distinções anatômicas e estruturais existentes no coração de peixes, como um RS esparsos, ausência de túbulos transversos (túbulos-T), miócitos relativamente pequenos (1 a 12,5  $\mu\text{m}$ ) em relação aos mamíferos (10 a 25  $\mu\text{m}$ ) (HELLE, 1983; KEEN et al., 1992) e miofibrilas periféricamente arranjadas são à base de importantes diferenças anatomo-fisiológicas, particularmente em relação à origem do cálcio a ser utilizado pelo aparato contrátil (TIBBITS et al., 1991).

FABIATO (1983) propôs que, em mamíferos, o influxo transsarcolemal de cálcio pela troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e de canais voltagem-dependentes tipo L (lentos) dispara a liberação de uma quantidade ainda maior destes íons pelo RS, através de canais de cálcio denominados canais de rianodina, um mecanismo conhecido como liberação de cálcio cálcio-induzida (BERS, 1991; FRANK, 2003). No entanto, a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  removida da célula durante o relaxamento é a mesma que entra pela sarcolema a cada batimento, sendo que a célula não ganha nem perde íons  $\text{Ca}^{2+}$  (BERS, 2002).

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 cálcio liberado do RS constitui-se na fonte principal deste íon para a contração no coração de todos os mamíferos estudados (WIER, 1990).

Por outro lado, no coração dos vertebrados inferiores a situação parece ser muito diferente. TIBBITS et al. (1991), sugeriram que no miocárdio de anfíbios, o cálcio liberado do RS não é significativo para a contração, além de ter sido contestada a ocorrência de liberação de cálcio cálcio-induzida no ventrículo destes animais (FABIATO, 1983).

A rianodina, um alcalóide neutro extraído do vegetal *Ryania speciosa* (JONES et al., 1979), liga-se específica e irreversivelmente aos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS). Quando utilizada em concentrações micromolares (10-300  $\mu\text{M}$ ) (CORONADO et al., 1994), provoca uma diminuição da condutância destes canais ao cálcio, inibindo assim a função do RS como fornecedor de cálcio ao aparato contrátil do músculo cardíaco. Dessa forma, a rianodina tem sido utilizada para o teste da importância funcional do retículo sarcoplasmático no acoplamento excitação-contração de diversos vertebrados, inclusive peixes (DRIEDZIC & GESSER, 1988; HOVE-MADSEN, 1992; KEEN et al., 1994; GESSER, 1996; VORNANEN, 1996b; COYNE et al., 2000).

A contração ventricular tanto em anfíbios (BERS, 1985) quanto em teleósteos (HOVE-MADSEN & GESSER, 1989; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992, KEEN et al., 1994; GESSER, 1996; COSTA et al., 2000; RANTIN et al., 1998) parece ser relativamente insensível à rianodina, mesmo em concentrações que comprovadamente bloqueiam a liberação de cálcio do RS, quando os experimentos são conduzidos utilizando-se frequências estimulatórias e temperaturas dentro da faixa fisiológica.

Devido a essas observações, associadas à existência de uma maior razão superfície/volume – a qual também proporciona uma maior densidade de canais L (THOMAS et al., 1996) –, é de se esperar que no coração de vertebrados inferiores o transporte transsarcolemal de cálcio seja suficiente para permitir a contração (VORNANEN, 1997), a menos que outra organela, como a mitocôndria, seja capaz de contribuir com a regulação batimento-a-batimento da concentração intracelular de cálcio. Esta possível contribuição direta da mitocôndria tem sido descartada para o coração de mamíferos, baseada em uma variedade de argumentos cinéticos e farmacológicos (BASSANI et al., 1996). Contudo, a validade destes argumentos ainda necessita ser testada em peixes. Pelos motivos anteriormente mencionados, o papel do RS na geração da tensão no coração de vertebrados inferiores é normalmente desconsiderado (TIBBITS et al., 1990; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992).

TIBBITS et al. (1992a), destacam que, teoricamente, a diminuição do cálcio livre pode ser obtida por sistemas de transporte localizados em diferentes compartimentos: 1) a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; 2) a troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; 3) a bomba de cálcio na sarcolema e 4) a mitocôndria.

No coração de mamíferos, a bomba de cálcio do RS e a troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  da sarcolema são os principais mecanismos para reduzir a concentração citosólica de cálcio a fim de induzir o relaxamento máximo. De acordo com BERS (2002), sob condições normais, em ratos cerca de 80% do cálcio é removido pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, 28% pela troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  sarcolemal, e o restante pela bomba  $\text{Ca}^{2+}$  da sarcolema e tomada mitocondrial, sendo os dois últimos chamados de sistemas lentos, que aparentemente desempenham um papel muito reduzido no relaxamento cardíaco de mamíferos (BASSANI et al., 1996; MARENGO et al., 1997).

Os peixes, por sua vez, devido ao fato de apresentarem um RS relativamente menos desenvolvido e uma maior razão superfície/volume, diferem dos mamíferos em termos da contribuição relativa dos mecanismos para a movimentação de cálcio também no relaxamento cardíaco. Nos vertebrados inferiores, o influxo transsarcolemal relativamente grande de cálcio é removido do citosol, durante o relaxamento cardíaco, basicamente pela da troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e da bomba de cálcio sarcolemais (THOMAS et al., 1996), a primeira constituindo-se no principal mecanismo em teleósteos (TIBBITS et al., 1991; DRIEDZIC

& GESSER, 1994). Portanto, durante o ciclo cardíaco de peixes podemos observar uma importância reduzida do RS tanto como fornecedor quanto como armazenador de cálcio, o oposto ocorrendo com a sarcolema.

A relação entre força isométrica máxima e frequência de contração é documentada para diversas espécies de peixes. Em tiras ventriculares da maioria dos teleósteos, um aumento na frequência de contração reduz a duração do estado ativo, diminui a tensão isométrica máxima e, a maiores frequências, a taxa de contração (DRIEDZIC & GESSER, 1985; VORNANEN, 1989). Essa relação inversa entre tensão isométrica máxima e a frequência de contração na maioria dos teleósteos é referida como um efeito escada (“staircase”) negativo. Esta tendência a uma relação força-frequência negativa tende ainda a ser acentuada por elevações da temperatura na faixa de 5 a 25 °C (HOVE-MADSEN, 1992).

Segundo DRIEDZIC & GESSER (1985), a razão da ocorrência de uma relação força-frequência negativa apresentada pela maioria dos teleósteos está relacionada ao controle intracelular de cálcio. Uma menor capacidade de obtenção de cálcio livre a partir de reservas intracelulares nestes animais, associada a mecanismos sarcolemais de transporte deste íon insuficientes para a manutenção do inotropismo a elevadas taxas de estimulação determinam indiretamente o grau de (in)eficácia do acoplamento E-C no músculo cardíaco.

Por tudo o que foi descrito anteriormente, fica claro que a contribuição relativa do meio extracelular e do RS como fornecedores de  $Ca^{2+}$  varia grandemente entre as diferentes espécies. Várias espécies de peixes como a carpa cruciana (*Carassius carassius* - VORNANEN, 1989), o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhus* - DRIEDZIC & GESSER, 1988), a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* - COSTA et al., 2000), e o gobídeo de poça de maré (*Bathygobius soporator* - RANTIN et al., 1998) mostraram-se insensíveis à rianodina. Em espécies ativas, contudo, a rianodina reduziu o desenvolvimento de força em ~20% (cavala – *Scomber scombrus* - SHIELS & FARRELL, 2000) a 40% (atum - *Thunnus albacares* - SHIELS et al., 1997). Além disso, a sensibilidade à rianodina pode ser frequência-dependente e temperatura-dependente, como na truta, sendo maior em frequências sub-fisiológicas e altas temperaturas (KEEN et al., 1994; HOVE-MADSEN et al., 1998).

Dessa forma, para as espécies acima citadas, parece haver uma forte correlação entre nível de atividade, elevadas temperaturas e baixas frequências de estimulação e a presença de um RS funcional. No entanto, estudos realizados com espécies neotropicais indicaram grandes diferenças em relação à funcionalidade dessa organela como fornecedora de  $\text{Ca}^{2+}$  para a contração (RIVAROLI, 2002, ANELLI JR et al., 2004). Além de demonstrar a funcionalidade do RS sob condições fisiológicas de temperatura e frequência de estimulação, tais estudos indicaram que a relação entre funcionalidade do RS e o nível de atividade não é totalmente aplicável para espécies neotropicais.

Por ser tão importante, não somente para contração muscular, mas para diversas funções fisiológicas como a modulação de vias metabólicas, síntese e liberação de hormônios e crescimento celular (CARAFOLI, 1987), a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto extra como intracelular sofre controle homeostático muito delicado. Em mamíferos, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular é regulada principalmente pelos hormônios paratireóideo e calcitonina (NEMETH, 1995). Já a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  é precisamente regulada por mecanismos de extrusão e seqüestro de  $\text{Ca}^{2+}$  (CARAFOLI, 1994). Proteínas intrínsecas de membrana, tanto da membrana plasmática como da membrana intracelular, regulam a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por promoverem extrusão contínua de  $\text{Ca}^{2+}$  e apresentam diferentes afinidades ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Proteínas com atividade ATPásica, como a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, apresentam alta afinidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto proteínas trocadoras de íons, como a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , e proteínas que constituem canais, apresentam menor afinidade aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  (CARAFOLI, 1994).

A bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é o principal, senão o único mecanismo para o seqüestro de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS e desempenha um papel central no tamponamento destes íons. Em mamíferos, a alta afinidade por  $\text{Ca}^{2+}$  permite que este íon seja transportado para o interior do RS, mesmo quando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  se encontra em níveis sub-micromolares (NEMETH, 1995).

Existem semelhanças, mas também diferenças, entre as proteínas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática e do RS. Ambas são dependentes de  $\text{Mg}^{2+}$ . Entretanto, elas diferem no peso molecular; na estequiometria  $\text{Ca}^{2+}:\text{ATP}$  (1:1 na membrana plasmática; 2:1 no RS); e nas proteínas que modulam suas atividades (O'DONNELL & OWEN, 1994).

A importância dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  no processo de contração, bem como a origem extra ou intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  para diferentes estímulos de contração, pode ser avaliada por meio de

experimentos de contração isométrica. Informações importantes a respeito dos mecanismos envolvidos no controle da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular vêm sendo obtidas pela utilização de drogas ou procedimentos que bloqueiam o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (meio extracelular zero- $\text{Ca}^{2+}$ ; bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ ), promovem liberação e fornecimento de  $\text{Ca}^{2+}$  ao espaço intracelular (cafeína, agonistas em meio com zero- $\text{Ca}^{2+}$ , adição de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular) ou que interferem com seu armazenamento (tapsigargina, ácido ciclopiazônico e rianodina). Esta é uma técnica valiosa, que vem sendo utilizada há bastante tempo, para análise funcional de diferentes fatores envolvidos nos processos de contração e relaxamento muscular.

O uso de adrenalina tem sido descrito em experimentos de contração muscular cardíaca numa tentativa de explorar os efeitos mediados pela ativação de  $\beta$ -adrenoreceptores, no que se refere ao ajuste na disponibilidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para desenvolvimento de contração muscular. Adicionalmente, aumentos nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular podem aumentar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  transarcolemal sem ativação de qualquer via de transdução de sinal. Ambos procedimentos, em conjunto com aplicação de rianodina, foram utilizados no presente estudo para fornecer informações adicionais da importância relativa do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intra e extracelular durante o acoplamento E-C no miocárdio ventricular de *Synbranchus marmoratus*. Neste estudo, foram utilizados níveis fisiológicos de estimulação adrenérgica para promover uma resposta relevante, sobretudo para avaliar o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto pela sarcolema como pelo RS, em presença ou ausência de rianodina.

Foram realizadas medidas de contração muscular com intervenções fisiológicas e farmacológicas que interferem na disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$ , numa tentativa de abordar as alterações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares observadas durante diferentes protocolos experimentais.

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de elucidar alguns dos mecanismos intracelulares envolvidos com a regulação do  $\text{Ca}^{2+}$  no acoplamento E-C do miocárdio ventricular no teleósteo neotropical muçum, *Synbranchus marmoratus*, submetido a diferentes temperaturas. Os seguintes parâmetros foram determinados:

- a) Respostas cronotrópicas do miocárdio ventricular por meio de registros eletrocardiográficos da frequência cardíaca *in vivo* durante transições agudas da temperatura de 25 para 35 °C e de 25 para 15 °C, e durante a recuperação subsequente a 25 °C;
- b) Efeito do tempo de exposição prolongada (40 minutos) a diferentes temperaturas experimentais (15, 25 e 35 °C) sobre a força de contração das tiras ventriculares eletricamente estimuladas para verificação de possível deterioração;
- c) Importância do cálcio extracelular para o acoplamento E-C do miocárdio ventricular a 15, 25 e 35 °C, por meio do estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de cálcio ao meio extracelular e pela estimulação adrenérgica;
- d) Efeitos do aumento da taxa de estimulação sobre a força de contração e sobre os processos tempo-dependentes (tempos para que o pico máximo de força seja atingido - TPT e para 50 % de relaxamento -THR) de tiras ventriculares submetidas a diferentes temperaturas (15, 25 e 35 °C);
- e) Importância do retículo sarcoplasmático como fornecedor de cálcio ao aparato contrátil a 15, 25 e 35 °C, por meio da comparação da força de contração desenvolvida pelas tiras ventriculares na presença ou ausência de rianodina.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material**

Foram utilizados no presente estudo, exemplares adultos de ambos os sexos de muçum, *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795).

Os fatores determinantes para a escolha destas espécies como material de estudo foram, dentre outros, o fato de ser espécie nativa, tipicamente neotropicais, a diferença de seu hábitos e habitats, sua importância biológica na fauna local, facilidade de coleta e manutenção em condições de laboratório e principalmente, por pertencer a superordem OSTARIOPHYSI.

##### **3.1.1. Posição Sistemática das Espécies**

A espécie em questão ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTHYES

Subclasse: ACTINOPTERIGII

Divisão: TELEOSTEI

Superordem: ACANTHOPTERYGII

Ordem: SYNBRANCHIFORMES

Família: SYNBRANCHIDAE

Gênero: *Synbranchus*

Espécie: *Synbranchus marmoratus*

##### **3.1.2. Breves Considerações Sobre a Espécie Estudada**

Conhecido no Brasil como muçum, *Synbranchus marmoratus* (figura 1) é comumente chamado de enguia, embora não seja uma enguia verdadeira, as quais pertencem a família Anguillidae. É uma espécie demersal, de água doce e salobra, habitando



águas tropicais e subtropicais, encontrada na América Central e do Sul, desde o México até o norte da Argentina.

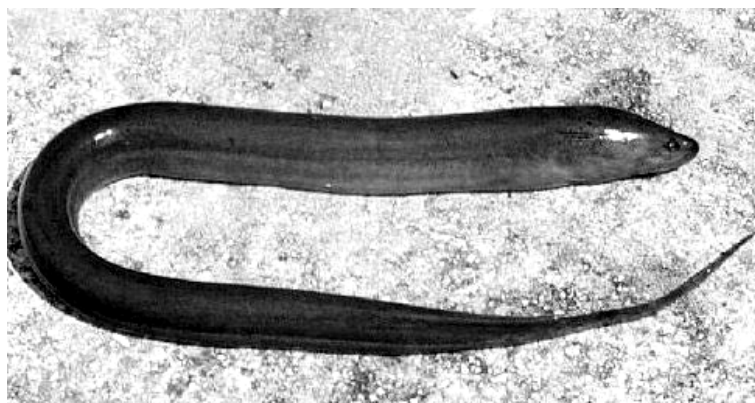


Figura 1. Exemplar adulto de muçum, *Synbranchus marmoratus* (fotografado por Leo G. Nico, USGS, Gainesville, Florida/USA)

Possui respiração aérea acessória, utilizando-se de sua câmara buco-faríngea modificada, podendo viver tanto em águas pobres como ricas em oxigênio (ROBINS, 1991; KENNY, 1995). Facilmente reconhecida por possuir uma única abertura branquial localizada abaixo da cabeça, corpo cilíndrico e longo, olhos pequenos, nadadeiras dorsais e anais vestigiais, não possuindo nadadeiras ventrais e peitorais. Habitam águas claras ou túrbidas de corredeiras, rios, lagos, canais, reservatórios e campos de arroz. São noturnos e carnívoros.

No início da estação seca, quando o nível da água declina, constroem um “cocoon” no sedimento, onde se enterram e passam um período de dormência em épocas de estiagem até a chegada da estação chuvosa. Este “cocoon”, em grande parte sub-horizontal, pode ter vários divertículos, seguidos por uma secção vertical que leva ao exterior por uma abertura única (GRAHAM et al., 1995; KENNY, 1995). Embora seu metabolismo diminua muito durante este período, o peixe permanece ativo (ROBINS et al., 1991).

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Coleta e Manutenção em Laboratório**

Os exemplares de *S. marmoratus* ( $Wt = 130 \pm 25g$ ) utilizados no presente estudo foram coletados em várzeas do rio Paraná, junto à cidade de Castilho (SP), acondicionados em tanques de 25 a 50 litros e imediatamente transportados ao Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, onde foram realizados os experimentos.

Em laboratório, os peixes foram mantidos em tanques de 500 a 1000 litros dotados de circulação contínua de água (1,2 l/min) e temperatura controlada ( $25 \pm 1$  °C) por, no mínimo, 45 dias. Estudos prévios (HARDER et al., 1999) demonstraram que esse período é suficiente tanto para a recuperação do estresse decorrente da coleta e transporte, como para a aclimatação às condições laboratoriais. Os peixes receberam alimentação semanal composta por peixes de pequeno porte e files de peixes, sendo que os animais utilizados nos experimentos *in vivo* tiveram alimentação suspensa por 24 h antes do início dos experimentos.

### **3.2.2. Preparações Experimentais**

#### **3.2.2.1. Experimentos *In Vivo***

As preparações empregadas para a obtenção dos eletrocardiogramas (ECG) para análise da frequência cardíaca foram baseadas na metodologia utilizada por GLASS et al. (1991) e adaptada por RANTIN et al., (1993).

Os animais foram pesados e medidos e então imersos, por cerca de 15 min, em uma solução de benzocaína 0,25% ( $C_9H_{11}NO_2$  – Labsynth). Isto proporcionou um nível adequado de anestesia, enquanto os movimentos respiratórios espontâneos foram preservados.

Imediatamente após a anestesia, os animais foram transferidos para uma mesa cirúrgica para implantação dos eletrodos ativos (ou exploradores) a fim de se obter os

traços eletrocardiográficos. Durante a cirurgia, um eletrodo positivo foi introduzido na região mediana próximo ao coração e um negativo, mais abaixo, na mesma direção do primeiro. Os eletrodos foram suturados 2 pontos cirúrgicos na musculatura corpórea para evitar seu deslocamento. Um terceiro eletrodo, de referência, foi colocado na água da câmara experimental. Os eletrodos foram conectados ao acoplador universal de um registrador Narcotrace 40 (Narco Bio Systems, Houston, TX, EUA). Essa preparação permitiu a obtenção de registros similares àqueles observados na derivação I (D<sub>I</sub>) da eletrocardiografia padrão.

Após a cirurgia, os animais foram introduzidos em uma câmara de contenção e transferidos para o tanque experimental, no qual a água foi mantida com oxigenação contínua (normóxia) na temperatura de aclimação (25 °C). Seguiu-se então um período de recuperação mínimo de 24 horas, após o qual os protocolos experimentais foram desenvolvidos. As temperaturas foram ajustadas por um termostato FAC-TempControl (FAC, São Carlos, SP, Brasil).

### 3.2.2.2. Experimentos *In Vitro*

As preparações experimentais foram efetuadas de acordo com os procedimentos inicialmente propostos por GESSER (1977), com algumas modificações, descritas a seguir.

Os animais foram sacrificados por meio de uma forte pancada na região cefálica e pesados. O coração foi retirado e colocado em solução fisiológica gelada própria para peixes teleósteos, com a seguinte composição (mM):

Substância	NaCl	KCl	MgSO <sub>4</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	Glicose
[ ] – mM	125	2,5	0,94	30	1	1,25	10

O pH da solução foi de 7,4 a 25° C.

Cada tira, com diâmetro de aproximadamente de 1 a 2 mm, peso médio de 1,8 mg e comprimento máximo de 0,5 cm foi transferida, imediatamente após a preparação, para um banho contendo 50 ml de solução fisiológica já termostatizada à temperatura de 25°C e dotado de borbulhamento constante de mistura carbogênica (98% O<sub>2</sub> e 2% CO<sub>2</sub>). Uma extremidade da tira foi fixada, com auxílio de uma argola de metal em espiral, a um gancho construído na parte terminal de um eletrodo de estimulação de platina.

A outra extremidade foi conectada, com linha cirúrgica (0,7/6-0 – Ethicon), a um transdutor de força isométrica Letica TRI 110 (Letica Scientific Instruments) para que o registro das contrações isométricas em um registrador Narcotrace 40 (Narco Bio-Systems). Um segundo eletrodo de platina foi colocado no interior do banho ao lado do primeiro. Os eletrodos de estimulação foram acoplados a estimuladores construídos na oficina eletrônica do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa, os quais geram pulsos elétricos quadrados com 8 ms de duração e uma voltagem 50% superior àquela que atingir o limiar da resposta mecânica, permitindo assim a estimulação elétrica das tiras para o desenvolvimento da força de contração a diferentes taxas. Este equipamento possui as mesmas especificações eletrônicas dos estimuladores Grass SD9 (Quincy, Mass., USA).

As tiras foram então estimuladas a uma frequência constante de 0,2 Hz (0.2 pps ou 12 bpm) e estiradas, utilizando-se um micromanipulador, para aumentar a distância entre o transdutor e o gancho de fixação até que uma relação constante entre o comprimento da preparação e o pico da força de contração fosse obtida. Este pequeno estiramento foi feito numa tentativa de diminuir o impacto da orientação celular indefinida da preparação (GESSER, 1996).

Depois da estabilização, seguiu-se um período de repouso de 30 minutos, após o qual os diferentes protocolos experimentais foram aplicados, incluindo alteração da temperatura, elevação da taxa de estimulação, alterações do conteúdo de cálcio e adição de rianodina e adrenalina.

### **3.2.3. Protocolos Experimentais**

#### **3.2.3.1. Experimentos *In Vivo***

##### **3.2.3.1.1. Redução da Temperatura**

Após um período de recuperação, a frequência cardíaca ( $f_H$ ) foi registrada na temperatura de aclimatação (25 °C) e a temperatura da água foi gradualmente reduzida (10°C.h<sup>-1</sup>) até atingir 15 °C e então gradualmente elevada até retornar à temperatura inicial. Foram realizados registros da  $f_H$  a cada 5°C, sendo que cada temperatura experimental foi

mantida por um período de 25 min, seguidas por 5 min adicionais, durante os quais os registros foram obtidos. A  $f_H$  foi expressa em batimentos cardíacos por minutos (bpm).

### **3.2.3.1.2 . Aumento da Temperatura**

Após um período de recuperação, a frequência cardíaca ( $f_H$ ) foi registrada na temperatura de aclimatação (25 °C) e a temperatura da água foi gradualmente aumentada ( $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ ) até atingir 35 °C e então gradualmente reduzida até retornar à temperatura inicial. Os procedimentos para os registros da  $f_H$  foram os mesmo descritos para redução de temperatura, ou seja, foram feitos registros em intervalos de 5°C durante 5 min, após manter-se cada temperatura por 25 min.

### **3.2.3.2. Experimentos *In Vitro***

#### **3.2.3.2.1. Efeito do Tempo**

As preparações foram mantidas a 15, 25 e 35 °C em um banho contendo 1,25 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  durante um período de 40 minutos durante o qual, a força de contração isométrica à taxa de estimulação de 0,2 Hz foi registrada ininterruptamente. Ao final dos 40 minutos, registros rápidos da Fc ( $25 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) foram efetuados por 10-15 segundos para as medidas de possíveis variações nos parâmetros tempo-dependentes: tempo para atingir o pico máximo de força (TPT – ms) e tempo para atingir 50% do relaxamento (THR – ms).

Tal protocolo foi desenvolvido para avaliar a possível ocorrência de uma deterioração da força de contração isométrica no decorrer do período experimental.

#### **3.2.3.2.2. Efeito do Aumento da Concentração de Cálcio**

Os pares de tiras ventriculares foram estabilizados a 0,2 Hz na temperatura de aclimatação (25 °C) em um banho contendo 1,25 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , por um período de aproximadamente 15 min. Após este período, foram efetuados registros do desenvolvimento de força isométrica das tiras por 3 min.

A seguir, as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  das preparações foram elevadas em 2 mM a cada 10 minutos (por meio da adição de  $\text{CaCl}_2$ ) ou após cada concentração ter produzido seu efeito completo. Os registros foram efetuados ao longo de todo o experimento. O mesmo protocolo foi repetido, porém nas temperaturas de 15 e 35 °C. Em cada concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , registros rápidos da força de contração foram efetuados para a análise dos parâmetros tempo-dependentes.

#### **3.2.3.2.3. Tensão Pós-Repouso**

Este procedimento foi conduzido com o intuito de analisar-se a capacidade de armazenamento intracelular de cálcio durante o período de repouso.

As tiras ventriculares foram estabilizadas a uma frequência de estimulação constante de 0,2 Hz. Ao final do período de estabilização, registros rápidos da força de contração foram realizados. Seguiu-se então um período de repouso de 5 min, após o qual as tiras foram novamente estimuladas. A primeira contração registrada após o primeiro estímulo foi considerada a tensão pós-repouso (TPR).

Para a determinação da importância funcional do retículo sarcoplasmático nessa espécie, o protocolo experimental acima descrito foi repetido. Porém, um dos banhos recebeu 10  $\mu\text{M}$  de rianodina (Sigma -  $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_9$ ) 30 minutos antes do início do experimento.

#### **3.2.3.2.4. Relação Força-Frequência**

Os protocolos descritos a seguir foram realizados com o objetivo de determinar a capacidade do miocárdio da espécie em manter o acoplamento excitação-contração após incrementos da frequência cardíaca em diferentes temperaturas e a participação do retículo sarcoplasmático neste processo.

#### **3.2.3.2.4.1. Preparações Controle**

Após o período de estabilização a 25 °C, as taxas de estimulação impostas sobre as tiras ventriculares em um meio contendo uma concentração fisiológica de  $\text{Ca}^{2+}$  (1,25 mM) foram progressivamente aumentadas a partir de 0,2 Hz (12 bpm) até que os registros obtidos se tornassem irregulares. Adicionalmente, após cada incremento na taxa de estimulação, efetuou-se registros rápidos da Fc para a medida de possíveis variações nos parâmetros tempo-dependentes. Estes procedimentos foram realizados nas temperaturas experimentais de 15, 25 e 35 °C.

#### **3.2.3.2.4.2. Baixa Concentração de Adrenalina ( $10^{-8}$ M)**

O mesmo procedimento experimental anteriormente descrito (item 3.2.3.2.4.1) foi adotado, ou seja, registrou-se o efeito do aumento na frequência de estimulação sobre a Fc e os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* até que os registros se tornassem irregulares para as temperaturas experimentais de 15, 25 e 35 °C. Porém neste caso, com adição de  $10^{-8}$  M de adrenalina (Sigma<sup>®</sup>). De acordo com SHIELS & FARRELL (1997), esta concentração de adrenalina equivale à concentração tônica encontrada no plasma de peixes teleosteos em repouso.

#### **3.2.3.2.4.3. Baixa Concentração de Adrenalina + Rianodina**

O mesmo procedimento experimental descrito no item 3.2.3.2.4.2 foi adotado, ou seja, as tiras ventriculares foram submetidas a incrementos sucessivos da frequência de estimulação nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C, em um meio contendo concentrações fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (1,25 mM) e  $10^{-8}$  M adrenalina. Porém, foram adicionados ao banho 10  $\mu\text{M}$  de rianodina 30 min antes das alterações na frequência.

#### 3.2.3.2.4.4. Rianodia + Alta concentração de Adrenalina ( $10^{-5}$ M)

Este protocolo seguiu-se como descrito no item 3.2.3.2.4.3, nas temperaturas experimentais de 15, 25 e 35 °C. No entanto, a concentração de adrenalina foi elevada para  $10^{-5}$  M e a concentração de rianodina mantida em 10  $\mu$ M. Tais incrementos na concentração de adrenalina foram realizados no intuito de simular uma situação de estimulação adrenérgica máxima. Os incrementos na frequência de estimulação iniciaram-se 10 min após o incremento na concentração de adrenalina do banho.

### 3.3. ANÁLISE DOS DADOS

#### 3.3.1. Forma de Apresentação dos Resultados

Os resultados obtidos no presente estudo foram representados da seguinte forma:

- **Frequência Cardíaca ( $f_H$ ):** expressa em batimentos por minutos (bpm). Os valores de  $f_H$  obtidos durante a transição aguda da temperatura até 35 °C ou para 15 °C e após o retorno à temperatura de aclimatação são comparados aos valores iniciais observados a 25 °C.
- **Força de Contração ( $F_c$ ):** A  $F_c$  foi expressa em  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  nos protocolos em que foram analisados o efeito da adição de concentrações crescentes de cálcio ao meio extracelular, efeito do tempo de exposição e efeito do aumento da frequência de estimulação sobre o desenvolvimento de força das tiras ventriculares. Já no protocolo de análise da tensão pós-reposo (TPR), os valores da  $F_c$  na presença ou ausência de rianodina foram expressos como uma porcentagem da última contração registrada anteriormente ao repouso.
- **Cinéticas da Contração:**
  - **Tempo para o Pico de Tensão (TPT – Time to Peak Tension):** expressos em milissegundos (ms). Os valores de TPT obtidos em um mesmo protocolo experimental foram comparados aos valores iniciais. Adicionalmente, os



pontos correspondentes de diferentes protocolos experimentais também foram comparados entre si.

- **Tempo para 50% do Relaxamento (THR – time to half relaxation):** expressos em milisegundos (ms) e analisados como descrito para o TPT.

### 3.3.2. Tratamento Estatístico dos Dados

Os seguintes procedimentos estatísticos foram adotados para a análise dos dados obtidos no presente estudo:

Análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para verificar a existência de possíveis variações significativas entre os valores de um mesmo protocolo experimental. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de  $p$  foram menores que 0,05.

Teste de Mann-Whitney, para verificar a ocorrência de possíveis diferenças estatísticas significativas entre pontos correspondentes de diferentes protocolos experimentais. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de  $p$  foram menores que 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Freqüência cardíaca *in vivo*

#### 4.1.1. Efeito do Aumento da Temperatura e Retorno a 25 °C

Os valores médios da freqüência cardíaca ( $f_H$  – bpm) de muçum, *Synbranchus marmoratus* ( $n = 7$ ;  $Wt = 130 \pm 25g$ ), frente à elevação da temperatura de 25 para 35 °C e durante o retorno subsequente a 25 °C são apresentados na Tabela 1 e representados graficamente na Figura 2. A 25 °C, a  $f_H$  foi de  $31,1 \pm 1$  bpm, aumentando progressiva e significativamente a partir de 30°C, atingindo seus valores máximos a 35 °C ( $50,5 \pm 1,9$  bpm).

No retorno subsequente à temperatura de aclimação, os valores de  $f_H$  recuperaram os inicialmente observados tanto a 30 como a 25 °C ( $28,8 \pm 1,5$  bpm).

#### 4.1.2. Efeito da Diminuição da Temperatura e Retorno a 25 °C

Os valores médios da freqüência cardíaca ( $f_H$  – bpm) de muçum, *S. marmoratus* ( $n=7$ ;  $Wt = 130 \pm 25g$ ), frente à diminuição da temperatura de 25 para 15 °C e durante o retorno subsequente a 25 °C são apresentados na Tabela 1 e representados graficamente na Figura 3. A 25 °C a  $f_H$  foi de  $29,7 \pm 1,6$  bpm, aumentando progressiva e significativamente a partir de 20°C, atingindo seus valores mínimos a 15 °C ( $12,6 \pm 0,8$  bpm).

No retorno subsequente à temperatura de aclimação, os valores de  $f_H$  recuperaram os iniciais observados tanto a 20 como a 25 °C ( $27,3 \pm 2,3$  bpm).

Tabela 1. Valores de frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) *in vivo* de *S. marmoratus* em resposta à redução de temperatura de 25 para 15 °C (n = 7) e de aumentos da temperatura de 25 para 35 °C (n = 7) e ambos após retorno subsequente para 25 °C (25r). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. (\*\*) p < 0,01; (\*\*\*) p < 0,001

Temperatura (°C)	$f_H$ (bpm)	
25	31,2 $\pm$ 1,2	
30	40,8 $\pm$ 1,1	**
35	50,5 $\pm$ 0,7	***
30	39,0 $\pm$ 1,4	
25r	28,8 $\pm$ 2,3	
25	28,9 $\pm$ 0,9	
20	20,2 $\pm$ 2,4	**
15	12,7 $\pm$ 1,9	***
20	19,7 $\pm$ 2,3	***
25r	27,3 $\pm$ 1,6	

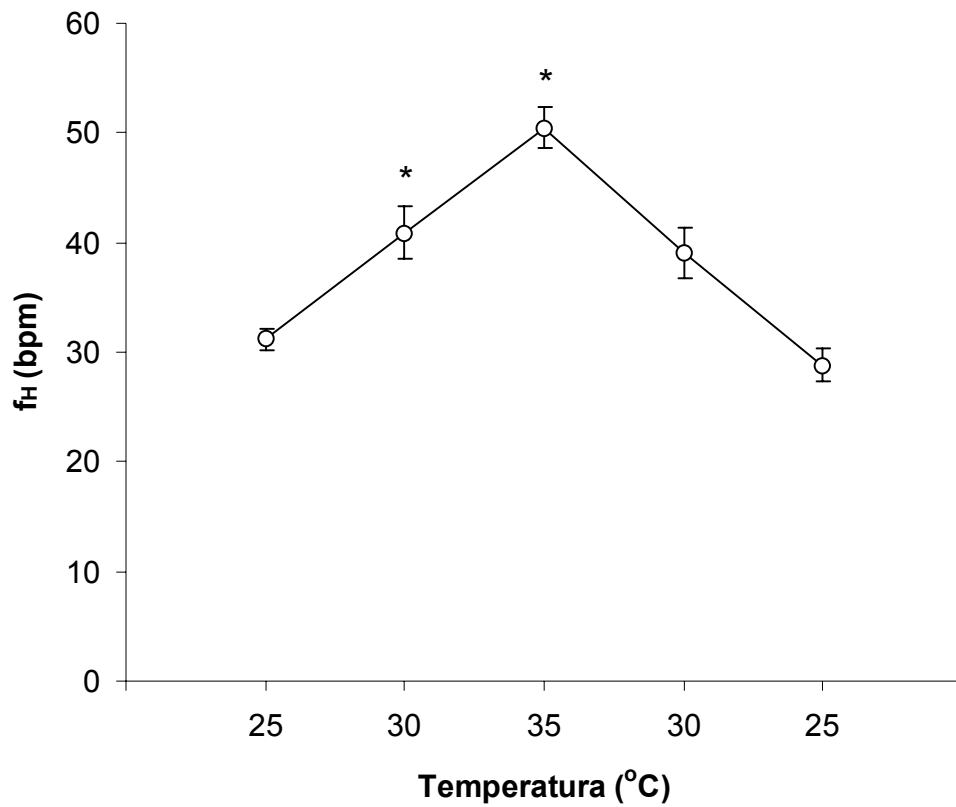


Figura 2. Efeito da elevação gradual da temperatura de 25 para 35  $^{\circ}\text{C}$  e da recuperação subsequente a 25  $^{\circ}\text{C}$  sobre a frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) *in vivo* de *S. marmoratus* ( $n = 7$ ). Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais.

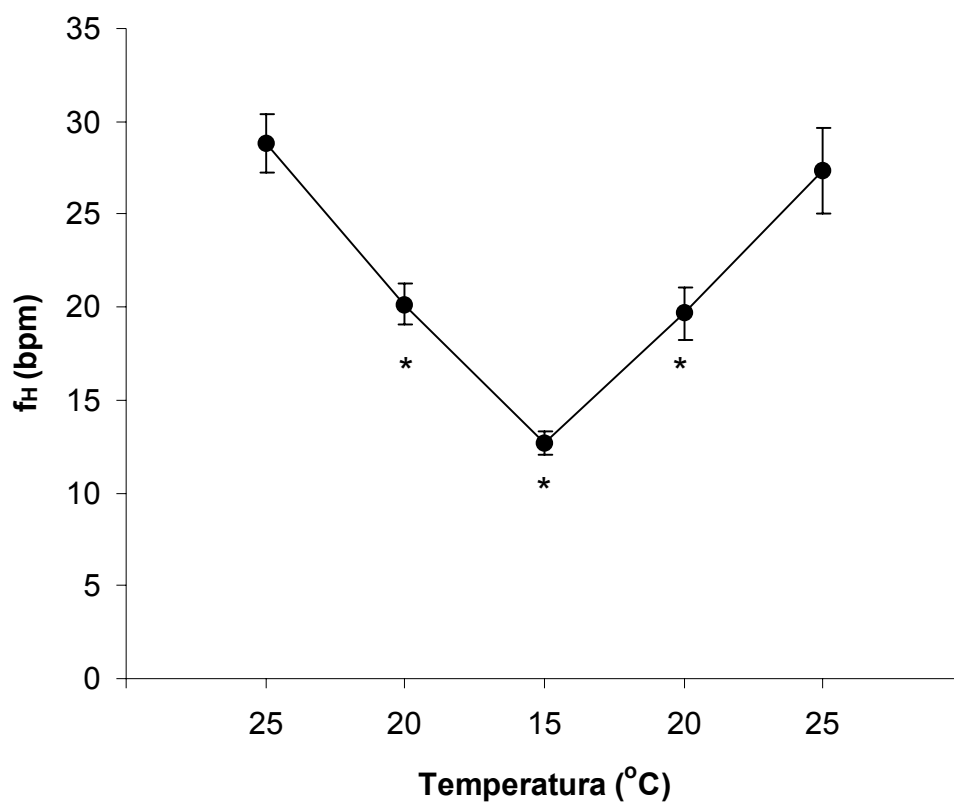


Figura 3. Efeito da redução gradual da temperatura de 25 para 15 °C e da recuperação subsequente a 25 °C sobre a frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) *in vivo* de *S. marmoratus* ( $n = 7$ ). Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. Músculo Cardíaco Isolado

### 4.2.1. Efeito do Tempo sobre a Força de Contração

Os valores médios da força de contração ( $F_c - \text{mM} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* ( $n=10$ ), obtidos após 40 minutos de estimulação a 0,2 Hz em concentrações fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (1,25mM), nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C, encontram-se na tabela 2 e representados graficamente na figura 4.

A  $F_c$  foi mantida constante ( $p > 0,05$ ) ao longo de todo o período experimental e em todas as temperaturas testadas.

### 4.2.2. Aumento Progressivo na Concentração de Cálcio Extracelular

#### 4.2.2.1. Efeito do aumento progressivo do cálcio extracelular a 15 °C

Os valores médios da força de contração isométrica ( $F_c - \text{mM} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* ( $n=10$ ) na temperatura de 15 °C quando submetidas a incrementos sucessivos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular estão apresentados na tabela 3 e representados graficamente na figura 5.

A análise dos resultados obtidos indicou não haver alteração significativa da  $F_c$  em relação aos valores iniciais (1,25 mM).

A figura 6 apresenta os valores médios de TPT e THR desenvolvidos pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta ao aumento progressivo na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular na temperatura de 15 °C. Estes valores apresentados na tabela 3.

Os incrementos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a 15 °C não afetaram significativamente o tempo necessário para que o pico máximo de tensão (TPT) fosse atingido. De mesmo modo, o tempo para 50% do relaxamento (THR) também não foi afetado pelos incrementos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Tabela 2. Valores da força de contração ( $F_c - \text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* ( $n = 10$ ) a 15, 25 e 35 °C durante a exposição a um meio contendo 1,25 mM de  $\text{CaCl}_2$  durante um período de 40 minutos. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M.

Tempo (min)	F <sub>c</sub> (mN.mm <sup>-2</sup> )		
	15 °C	25 °C	35 °C
0	14,5 ± 0,6	17,8 ± 1,5	12,3 ± 1,1
10	14,4 ± 0,6	17,52 ± 1,6	12,2 ± 1,0
20	13,0 ± 1,1	17,1 ± 1,5	11,9 ± 4,1
30	13,9 ± 0,6	17,0 ± 1,2	11,7 ± 1,0
40	13,7 ± 0,6	16,9 ± 1,0	11,5 ± 1,0

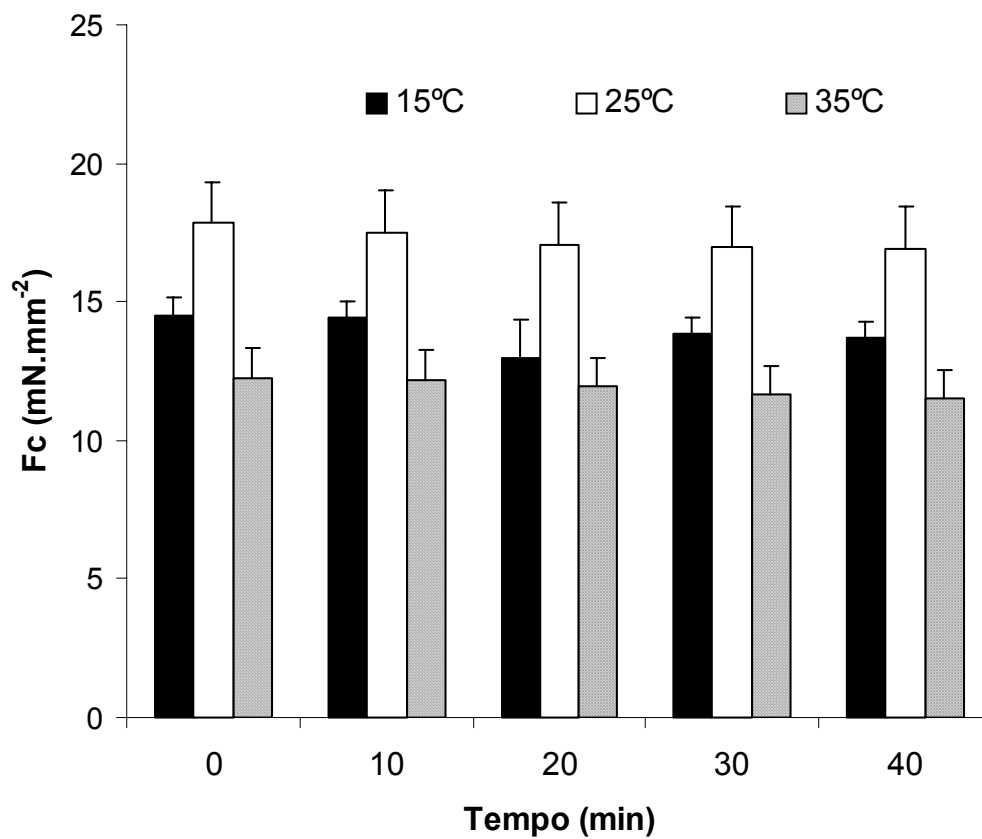


Figura 4. Efeito do tempo de exposição (40 min) sobre a força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C ( $n = 10$ ) em meio contendo 1,25 mM de  $\text{CaCl}_2$ . As barras verticais representam os valores médios  $\pm 1$  E.P.M.



Tabela 3. Valores da força de contração (Fc – mN.mm<sup>-2</sup>), do tempo de contração (TPT – ms) e do tempo para para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 15 °C. durante a elevação gradual da concentração de Ca<sup>2+</sup> no meio extracelular. Valores médios ± 1 E.P.M.

<b>Ca<sup>2+</sup></b> <b>(mM)</b>	<b>Fc</b> <b>(mN.mm<sup>-2</sup>)</b>	<b>TPT</b> <b>(ms)</b>	<b>THR</b> <b>(ms)</b>
<b>1,25</b>	13,7 ± 0,6	1455 ± 35,3	920 ± 48,4
<b>3,25</b>	13,7 ± 0,6	1475 ± 33,5	1000 ± 42,8
<b>5,25</b>	14,3 ± 0,7	1515 ± 37,3	1080 ± 66,7
<b>7,25</b>	14,5 ± 0,7	1555 ± 39,0	1165 ± 85,3
<b>9,25</b>	14,9 ± 0,7	1555 ± 49,1	1190 ± 86,2
<b>11,25</b>	15,3 ± 0,7	1565 ± 52,2	1245 ± 87,0

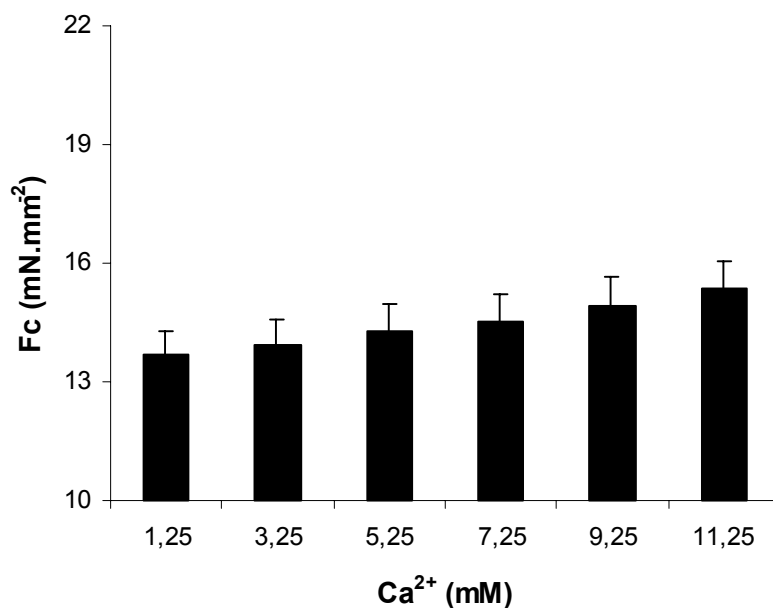


Figura 5. Efeito de aumentos na concentração extracelular de Ca<sup>2+</sup> (mM) sobre o desenvolvimento de força de contração (Fc – mN.mm<sup>-2</sup>) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) na temperatura de 15 °C. Valores médios + 1 E.P.M.

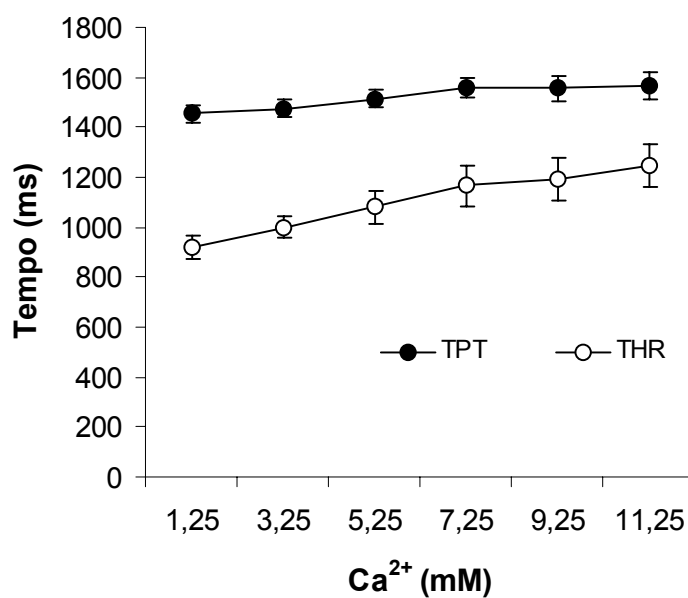


Figura 6. Efeito de aumentos na concentração extracelular de Ca<sup>2+</sup> (mM) sobre os tempos de contração (TPT - ms) e relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a temperatura de 15 °C. Valores médios ± 1 E.P.M.

#### 4.2.2.2. Efeito do aumento progressivo do cálcio extracelular a 25 °C

Os valores médios da Fc das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n=10) na temperatura de 25 °C quando submetidos a incrementos sucessivos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular estão apresentados na tabela 4. A representação gráfica destes resultados pode ser observada na figura 7.

Da mesma forma como registrado para 15 °C, a análise estatística dos valores de Fc obtidos a 25 °C revelam não ter havido alteração significativa da Fc ( $p > 0,05$ ) em nenhuma concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , apesar da tendência gráfica de elevação deste parâmetro.

A figura 8 apresenta os valores médios de TPT e THR desenvolvidos pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta ao aumento progressivo na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular na temperatura de 25 °C. Os valores são apresentados na Tabela 4.

O TPT não sofreu alterações significativas até a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular atingir 7,25 mM, a partir da qual os valores para o TPT tornam-se significativamente menores que os valores observados para as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  iniciais. Por outro lado, o THR não sofreu alterações significativas em nenhuma das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  testadas.

#### 4.2.2.3. Efeito do aumento progressivo do cálcio extracelular a 35 °C

Os valores médios da Fc das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n=10) na temperatura de 35 °C quando submetidos a incrementos sucessivos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular são apresentados na tabela 5 e representados graficamente na figura 9.

Diferente do observado nas demais temperaturas, a Fc obtida a 35 °C aumentou significativamente já a partir da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  de 3,25 mM.

A figura 10 apresenta os valores médios de TPT e THR desenvolvidos pelas tiras ventriculares em resposta ao aumento progressivo na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular na temperatura de 35 °C. Estes valores são representados na tabela 5.

Os incrementos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a 35 °C não alteraram significativamente o TPT. Porém, o THR aumentou significativamente a partir da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  de 7,25 mM.

Tabela 4. Valores da força de contração (Fc – mN.mm<sup>-2</sup>), do tempo de contração (TPT – ms) e do tempo para para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 25 °C. durante a elevação gradual da concentração de Ca<sup>2+</sup> no meio extracelular. Valores médios ± 1 E.P.M. Os asteriscos representam diferenças significativas (p < 0,05) em relação aos valores iniciais. (\*) p < 0,05; (\*\*) p < 0,01.

Ca <sup>2+</sup> (mM)	Fc (mN.mm <sup>-2</sup> )	TPT (ms)	THR (ms)
1,25	17,09 ± 1,07	763,3 ± 24,4	355 ± 20,1
3,25	18,17 ± 1,25	701,6 ± 29,5	355 ± 22,4
5,25	18,55 ± 1,19	665,0 ± 26,18	371 ± 23,6
7,25	19,19 ± 1,26	645,0 ± 40,3	375 ± 21,3
9,25	19,89 ± 1,10	630,0 ± 36,4 *	395 ± 22,5
11,25	20,25 ± 1,09	593,3 ± 41,3 **	406 ± 22,4

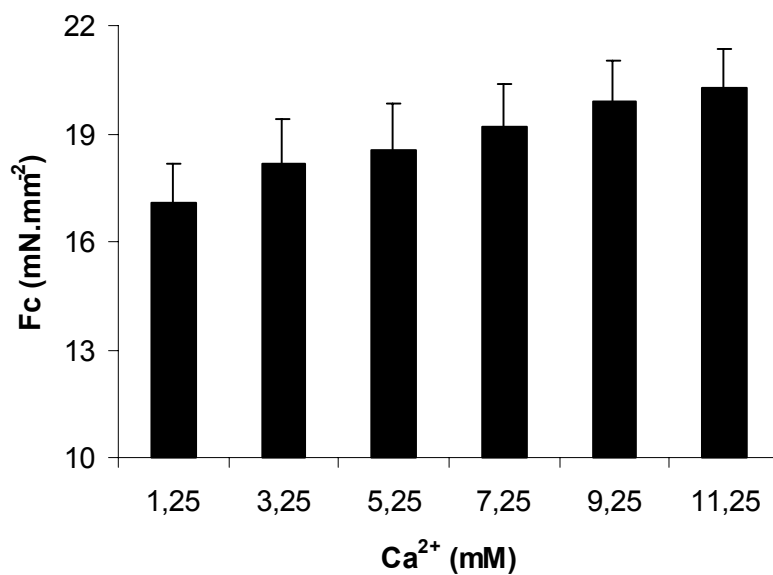


Figura 7. Efeito de aumentos na concentração extracelular de Ca<sup>2+</sup> (mM) sobre o desenvolvimento de força de contração (Fc – mN.mm<sup>-2</sup>) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) na temperatura de 25 °C. Valores médios + 1 E.P.M.

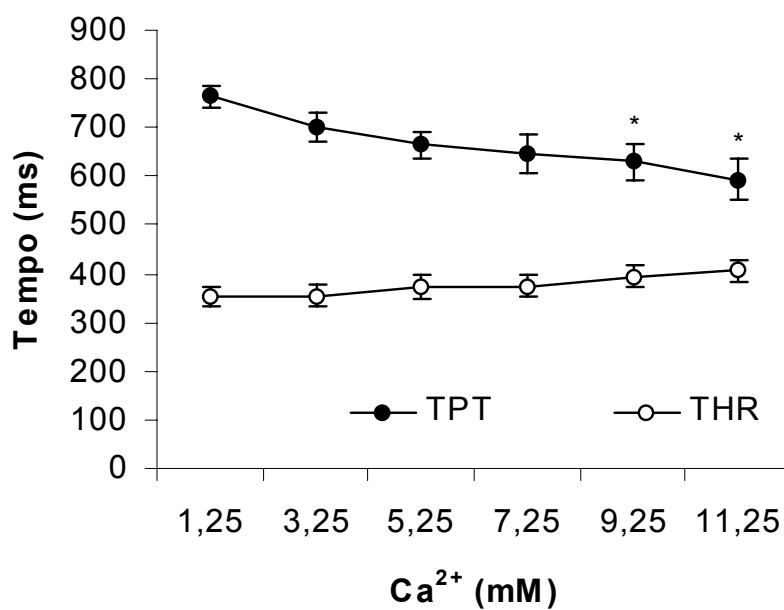


Figura 8. Efeito de aumentos na concentração extracelular de Ca<sup>2+</sup> (mM) sobre os tempos de contração (TPT - ms) e relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) na temperatura de 25 °C. Valores médios ± 1 E.P.M. (\*) - diferenças significativas (p < 0,05) em relação aos valores iniciais.

Tabela 5. Valores da força de contração (Fc – mN.mm<sup>-2</sup>), do tempo de contração (TPT – ms) e do tempo para para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 35 °C. durante a elevação gradual da concentração de Ca<sup>2+</sup> no meio extracelular. Valores médios ± 1 E.P.M. (\*) p < 0,05; (\*\*); p < 0,01.

Ca <sup>2+</sup> (mM)	Fc (mN.mm <sup>-2</sup> )	TPT (ms)	THR (ms)
1,25	12,2 ± 1,6	370,0 ± 26,2	183,3 ± 6,4
3,25	16,0 ± 1,8	343,3 ± 15,5	185,0 ± 4,3
5,25	20,3 ± 1,8 *	341,6 ± 12,5	195,0 ± 8,5
7,25	22,3 ± 1,9 *	325,4 ± 10,5	209,3 ± 11,5
9,25	23,7 ± 1,4 **	320,0 ± 9,6	236,6 ± 10,8 **
11,25	25,0 ± 1,9 **	306,6 ± 8,2	246,6 ± 18,5 **

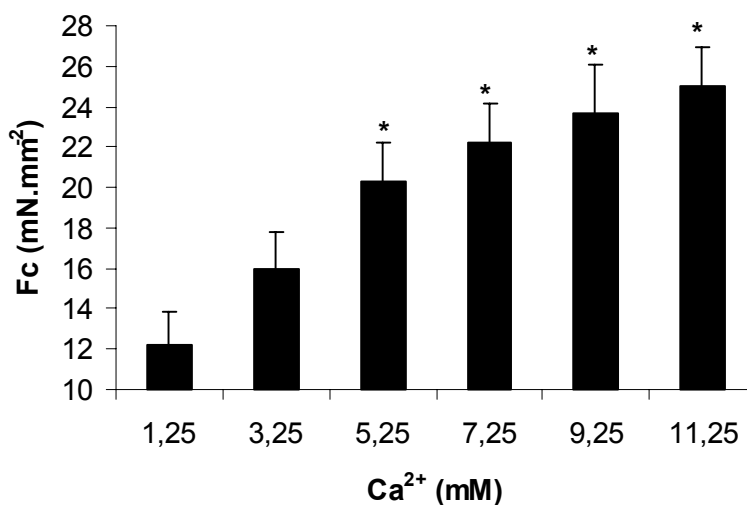


Figura 9. Efeito de aumentos na concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (mM) sobre o desenvolvimento de força de contração ( $F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* ( $n = 10$ ) na temperatura de  $35^\circ\text{C}$ . Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais.

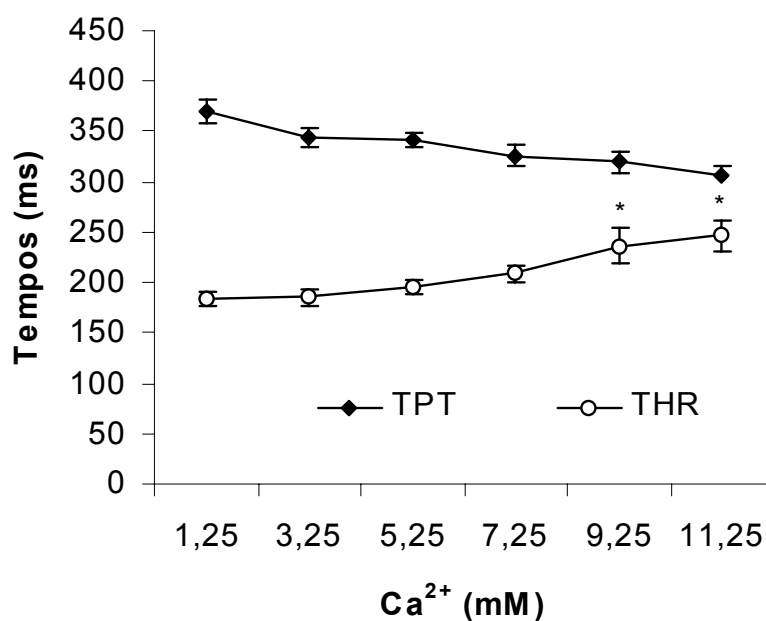


Figura 10. Efeito de aumentos progressivos na concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (mM) sobre os tempos de contração (TPT - ms) e relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* ( $n = 10$ ) a temperatura de  $35^\circ\text{C}$ . Os pontos representam os valores médios  $\pm 1$  E.P.M. (\*) - diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais.

#### 4.2.2.4. Comparações entre 15 x 25 x 35 °C

A figura 11 compara os valores de Fc das tiras ventriculares de *S. marmoratus* obtidas a 15, 25 e 35 °C, quando submetidas a aumento progressivo de concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Os valores de Fc obtidos a 15 °C foram sempre significativamente ( $p < 0,05$ ) menores que os obtidos a 25 e 35 °C, em todas as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  testadas. A 35 °C, incrementos nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular causaram significativo aumento da Fc quando as concentrações atingem valores superiores a 3,25 mM, sendo que a partir dessa concentração, os valores obtidos para a Fc ultrapassam os valores encontrados a 25 °C, só sendo significativamente superior à 25 °C na máxima concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (11,25 mM).

As figuras 12 e 13 apresentam a comparação entre os valores médios de TPT e THR, respectivamente, obtidos nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C, durante incrementos progressivos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Assim como ocorreu com os valores medidos para a Fc, os parâmetros tempo-dependentes obtidos a 15 °C foram significativamente maiores que os obtidos a 25 e 35 °C em todas as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  testadas. Tanto o TPT quanto THR foram significativamente ( $p < 0,05$ ) menores em todas as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  testadas a 35 °C quando comparadas com preparações em temperatura de aclimação.



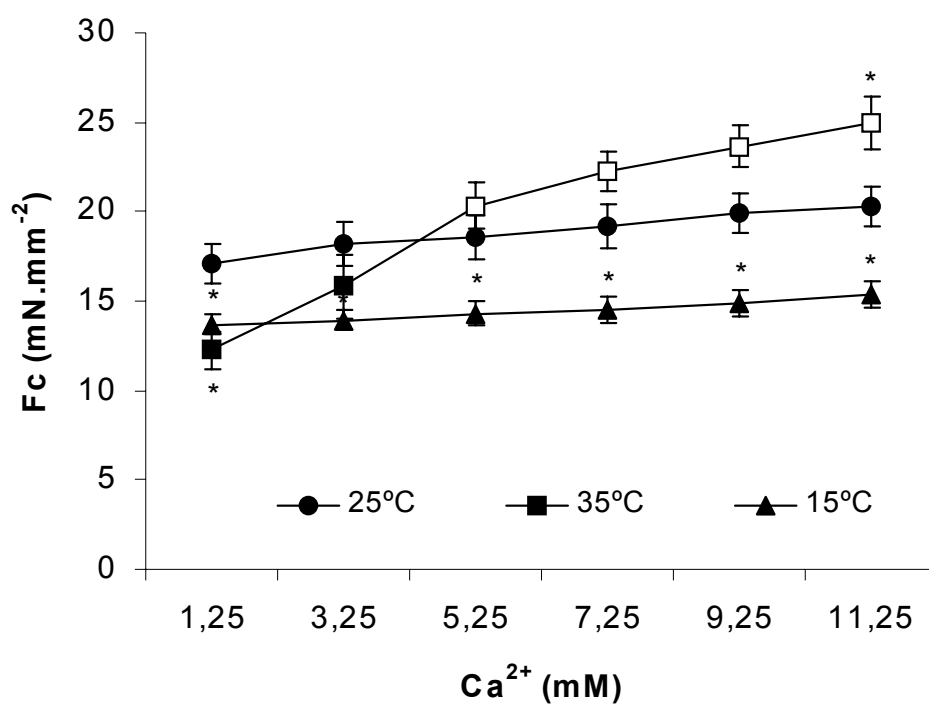


Figura 11. Diagrama comparativo do efeito de incrementos progressivos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre a força de contração ( $\text{Fc} - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de *S. marmoratus* ( $n = 10$ ) a 15, 25 e 35 °C. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à 25 °C.

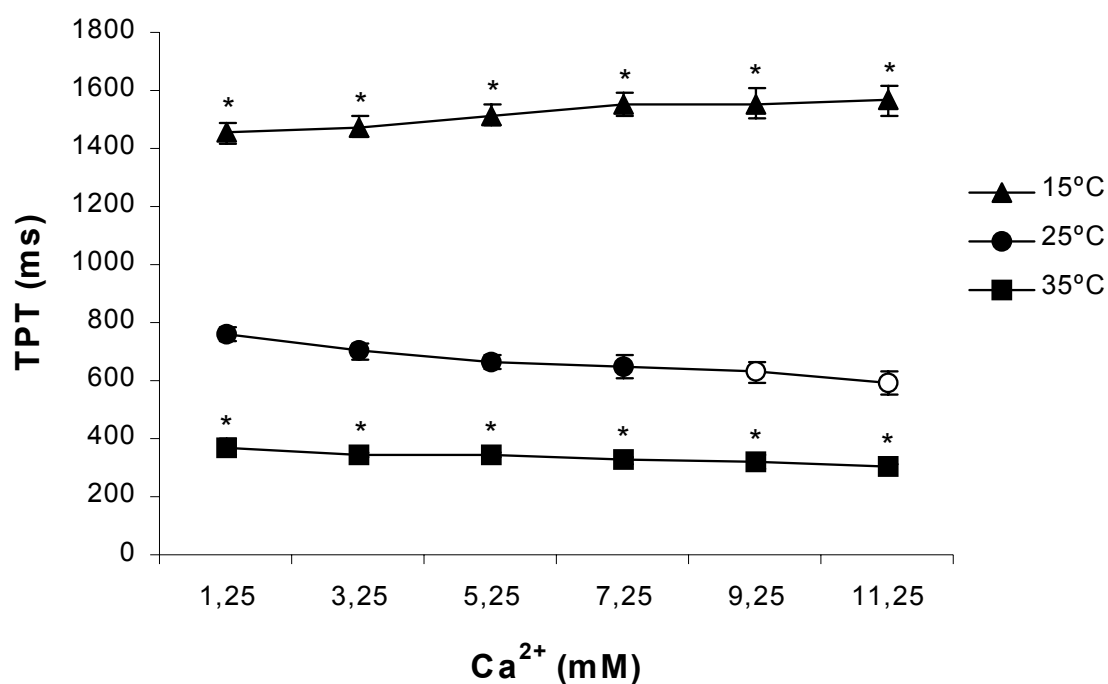


Figura 12. Diagrama comparativo do efeito de incrementos progressivos na concentração de Ca<sup>2+</sup> extracelular sobre o tempo para o pico máximo de tensão (TPT - ms) de tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 15, 25 e 35 °C. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas (p < 0,05) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas (p < 0,05) em relação aos valores obtidos à 25 °C.

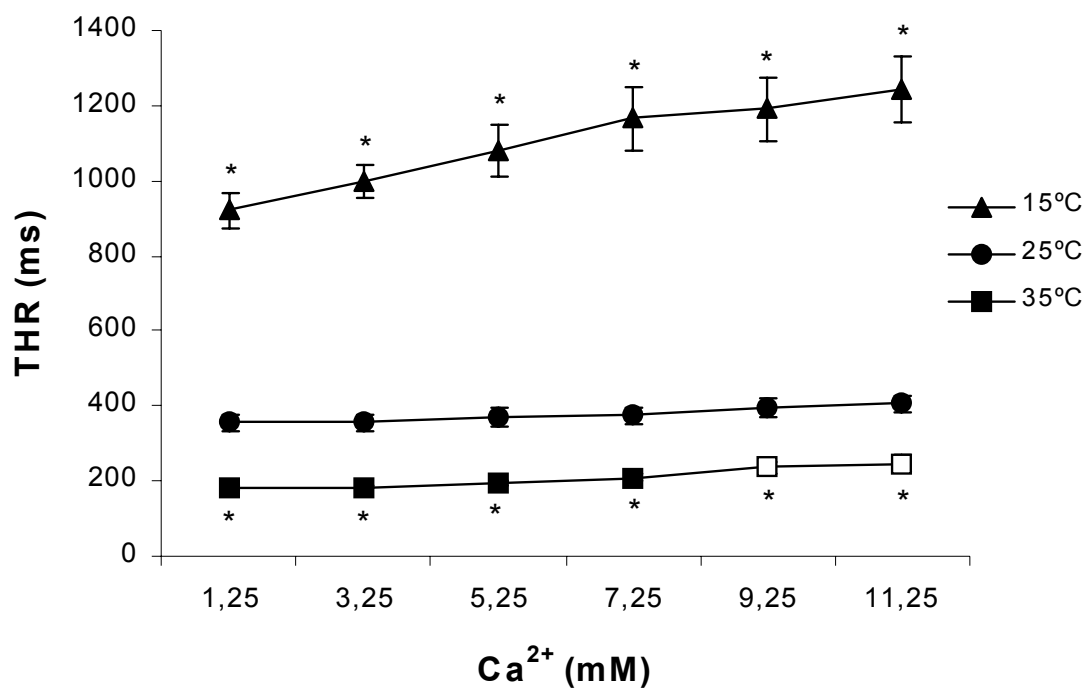


Figura 13. Diagrama comparativo do efeito de incrementos progressivos na concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular sobre o tempo para 50 % de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de *S. marmoratus* (n = 10) a 15, 25 e 35 °C. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à 25 °C.

### 4.2.3. Tensão (Fc) pós-reposo com e sem rianodina

Os valores médios da força de contração (Fc) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* nas temperaturas experimentais de 15, 25 e 35 °C após pausa diastólica prolongada e não fisiológica (tensão pós-reposo) de 5 minutos, são dados como uma porcentagem da última contração antes da pausa e estão apresentados na Tabela 6, que mostra os resultados obtidos na presença e na ausência de rianodina (10 µM). Tais valores também encontram-se representados graficamente na figura 14.

Na temperatura de 15 °C, o repouso causou uma resposta inotrópica positiva, ou seja, uma potenciação pós-reposo da Fc, tanto dos grupos controle como dos tratados com rianodina. A comparação dos valores de Fc pós-reposo e os observados imediatamente antes da pausa mostra uma potenciação de 23,1 % para o grupo controle e 17,6 % após adição de rianodina.

A 25 °C, o grupo controle apresentou significativa potenciação pós-pausa da Fc da ordem de 19,3 %. No grupo tratado com rianodina não houve potenciação da Fc após o repouso sendo os valores obtidos igualados aos valores encontrados antes da pausa.

Na temperatura de 35 °C, não houve nenhuma potenciação na tensão pós-reposo nos grupos controle, sendo que a Fc permaneceu inalterada após a pausa, quando comparadas com os valores obtidos antes do repouso. Porém, foi observada uma significativa queda no desenvolvimento de força após a pausa (decaimento pós-pausa) na presença rianodina (100 para  $76,6 \pm 4,6\%$ ).

Tabela 6. Valores da força de contração (Fc - % da última contração precedente ao repouso) após uma pausa de 5 min pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* nas diferentes temperaturas em preparações controle (n = 10) e em presença de 10  $\mu$ M de rianodina (n = 10). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M.

	Fc (% valores iniciais)		
	15 °C	25 °C	35 °C
<b>Controle</b>	123,1 $\pm$ 2,7	119,3 $\pm$ 1,5	92,6 $\pm$ 2,4
<b>Rianodina</b>	117,6 $\pm$ 2,3	96,5 $\pm$ 1,1	74,5 $\pm$ 3,3

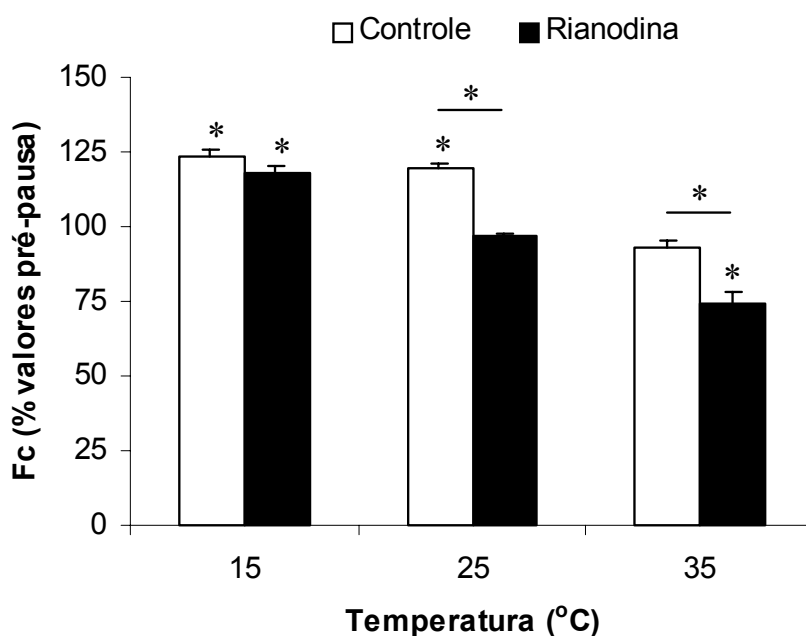


Figura 14. Efeito da temperatura sobre a tensão pós-pausa (Fc - % da força desenvolvida na última contração precedente ao repouso) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* após uma pausa em preparações controle (n = 10) e tratadas com 10  $\mu$ M de rianodina (n = 10). Uma frequência de estimulação de 0,2 Hz seguida por uma pausa diastólica de 5 min. As barras verticais representam valores médios + 1 E.P.M. Asteriscos acima das barras: diferença significativa em relação aos valores pré-pausa (p < 0.001). Asteriscos acima das linhas horizontais: diferença significativa entre os valores controle e após adição de rianodina (p < 0.001).

#### 4.2.4. Efeitos de Incrementos da Frequência de Estimulação

Os protocolos a seguir foram desenvolvidos com o objetivo de verificar-se o efeito de incrementos sucessivos na frequência de estimulação imposta sobre as tiras ventriculares de *S. marmoratus* nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C, durante diferentes tratamentos. Os tratamentos receberam as seguintes denominações: a) Controle - CTRL; b) Concentração tônica de adrenalina – ou baixa adrenalina - BA ( $10^{-8}$  M); c) Baixa adrenalina e rianodina - BA+RIAN ( $10^{-8}$  M e 10  $\mu$ M, respectivamente) e d) Alta adrenalina e rianodina - AA+RIAN ( $10^{-5}$  M e 10  $\mu$ M, respectivamente). Para tanto, avaliou-se a força de contração ( $F_c - \text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) e os processos tempo-dependentes (TPT e THR - ms).

A Tabela 7 apresenta os valores médios absolutos iniciais da  $F_c$ , do TPT e do THR, obtidos nos diferentes tratamentos nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C e frequência de estimulação de 0,2 Hz. As tabelas 8, 9 e 10 apresentam os valores médios de  $F_c$ , TPT e THR obtidos durante os incrementos na frequência de estimulação para todos os tratamentos, nas temperaturas experimentais de 15, 25 e 35 °C, respectivamente.

Os resultados indicam que as frequências máximas suportadas pelas tiras ventriculares (frequência máxima na qual pelo menos 80% das tiras ainda eram capazes de se contrair regularmente) foram maiores quando mais alta era a temperatura testada sendo 0,4 Hz a 15 °C, 1,4 Hz a 25 °C e 2,0 Hz a 35 °C. Os valores mínimos de  $F_c$  observados nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C foram 12,6, 17,5 e 12,5  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  respectivamente, nas frequências de 0,4, 1,4 e 2,0 Hz, frequência acima das quais os registros se tornaram irregulares.

A análise dos resultados mostra que os valores máximos obtidos pelas tiras ventriculares após incrementos na frequência de estimulação não se prolongaram após a adição de concentração mínima de adrenalina nas 3 temperaturas testadas.

Em todas as temperaturas experimentais, não foram detectadas diferenças significativa entre os valores de  $F_c$  obtidos para CTRL e BA em nenhuma das frequências testadas. Dessa forma, as preparações BA foram utilizadas como controle para a comparação com os resultados obtidos em BA + RIAN e AA + RIAN.

Tabela 7. Valores absolutos da força de contração isométrica (Fc), do tempo para o pico máximo de força (TPT) e do tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* na frequência de estimulação de 0,2Hz nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C e tratamentos (todos n = 10): Controle (CTRL); Baixa Adrenalina (BA); Baixa Adrenalina + Rianodina (BA+RIAN); Alta Adrenalina + Rianodina (AA+RIAN). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: ‡ - CTRL x BA; ☼ - BA x BA+RIAN; \* - BA+RIAN x AA+RIAN.

Temperatura	Tratamento	Fc (mN.mm <sup>-2</sup> )		TPT (ms)		THR (ms)	
15 °C	CTRL	15,0 $\pm$ 0,9		1530 $\pm$ 32		805 $\pm$ 50	
	BA	15,0 $\pm$ 0,8		1510 $\pm$ 19		840 $\pm$ 37	
	BA+RIAN	14,0 $\pm$ 0,9		1595 $\pm$ 21		830 $\pm$ 25	
	AA+RIAN	15,7 $\pm$ 0,8		1680 $\pm$ 40		950 $\pm$ 26	
25 °C	CTRL	17,5 $\pm$ 1,6		728 $\pm$ 18		370 $\pm$ 25	
	BA	17,9 $\pm$ 0,6	*	775 $\pm$ 35	*	333 $\pm$ 23	*
	BA+RIAN	10,3 $\pm$ 1,1	☼	738 $\pm$ 33		308 $\pm$ 20	
	AA+RIAN	21,1 $\pm$ 1,2		888 $\pm$ 21		453 $\pm$ 38	
35 °C	CTRL	12,5 $\pm$ 0,8		421 $\pm$ 10		246 $\pm$ 9	
	BA	12,5 $\pm$ 0,5	*	378 $\pm$ 19	‡	216 $\pm$ 8	‡
	BA+RIAN	7,1 $\pm$ 0,4	☼	352 $\pm$ 11	*	192 $\pm$ 8	*
	AA+RIAN	13,0 $\pm$ 0,5		412 $\pm$ 22		226 $\pm$ 5	

#### 4.2.4.1. Relação Força-Frequência à 15 °C

A Tabela 8 apresenta os valores médios da força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), do tempo para a pico de tensão (TPT – ms) e do tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares isoladas de *S. marmoratus* ( $n=10$ ) quando expostos a temperatura de 15 °C, obtidos durante aumentos progressivos na frequência de estimulação (Hz) em preparações controle (CTRL), concentração tônica de adrenalina – ou baixa adrenalina – (BA), baixa adrenalina e rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina e rianodina (AA+RIAN). Esses valores encontram-se graficamente representados nas figuras 15, 16 e 17.

Como mostrado na figura 15, na temperatura de 15 °C a  $F_c$  obtida na frequência máxima suportada ( $12,6 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  a 0,4 Hz) em preparações contendo BA não difere estatisticamente da  $F_c$  obtida na frequência inicial ( $15,0 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  a 0,2 Hz). O acréscimo de rianodina e alta adrenalina não alteraram este padrão de resposta. Não houve mudança significativa dos parâmetros tempo-dependentes com o aumento da frequência para 0,4 Hz, como mostrado nas figuras 16 e 17.



Tabela 8. Valores de força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações ( $n = 10$ ): Controle (CTRL – 1,25 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ); Baixa Adrenalina (BA –  $10^{-8}$  M); Baixa Adrenalina + Rianodina (BA+RIAN – 10  $\mu\text{M}$ ); Alta Adrenalina + Rianodina (AA+RIAN –  $10^{-5}$  M) na temperatura de 15 °C. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M.

Tratamento	Frequência (Hz)		
	0,2	0,4	
CTRL	<b>Fc (<math>\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}</math>)</b>	15,01 $\pm$ 0,9	12,62 $\pm$ 1,0
	<b>TPT (ms)</b>	1530 $\pm$ 32	1210 $\pm$ 29
	<b>THR (ms)</b>	805 $\pm$ 50	640 $\pm$ 41
BA	<b>Fc (<math>\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}</math>)</b>	15,03 $\pm$ 0,8	12,67 $\pm$ 1,1
	<b>TPT (ms)</b>	1510 $\pm$ 19	1250 $\pm$ 30
	<b>THR (ms)</b>	840 $\pm$ 37	650 $\pm$ 40
BA+RIAN	<b>Fc (<math>\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}</math>)</b>	13,97 $\pm$ 0,9	12,16 $\pm$ 1,0
	<b>TPT (ms)</b>	1595 $\pm$ 21	1245 $\pm$ 29
	<b>THR (ms)</b>	830 $\pm$ 25	645 $\pm$ 38
AA+RIAN	<b>Fc (<math>\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}</math>)</b>	15,68 $\pm$ 0,8	13,11 $\pm$ 0,9
	<b>TPT (ms)</b>	1680 $\pm$ 40	1360 $\pm$ 38
	<b>THR (ms)</b>	950 $\pm$ 26	680 $\pm$ 35

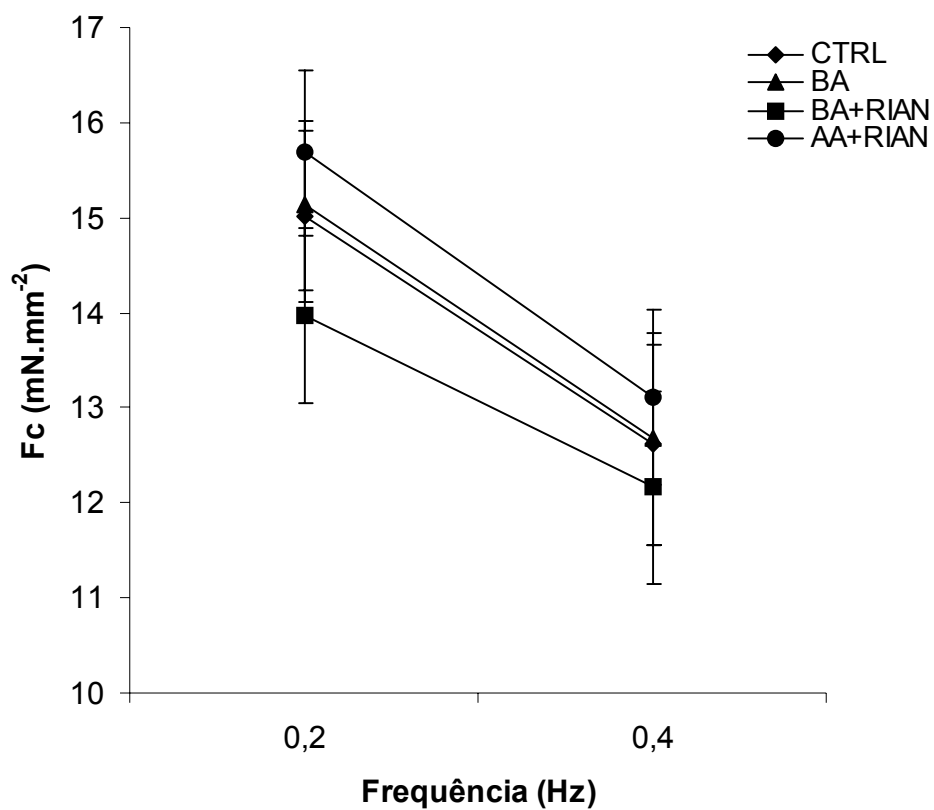


Figura 15. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre a força de contração ( $F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 15 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm 1$  E.P.M.

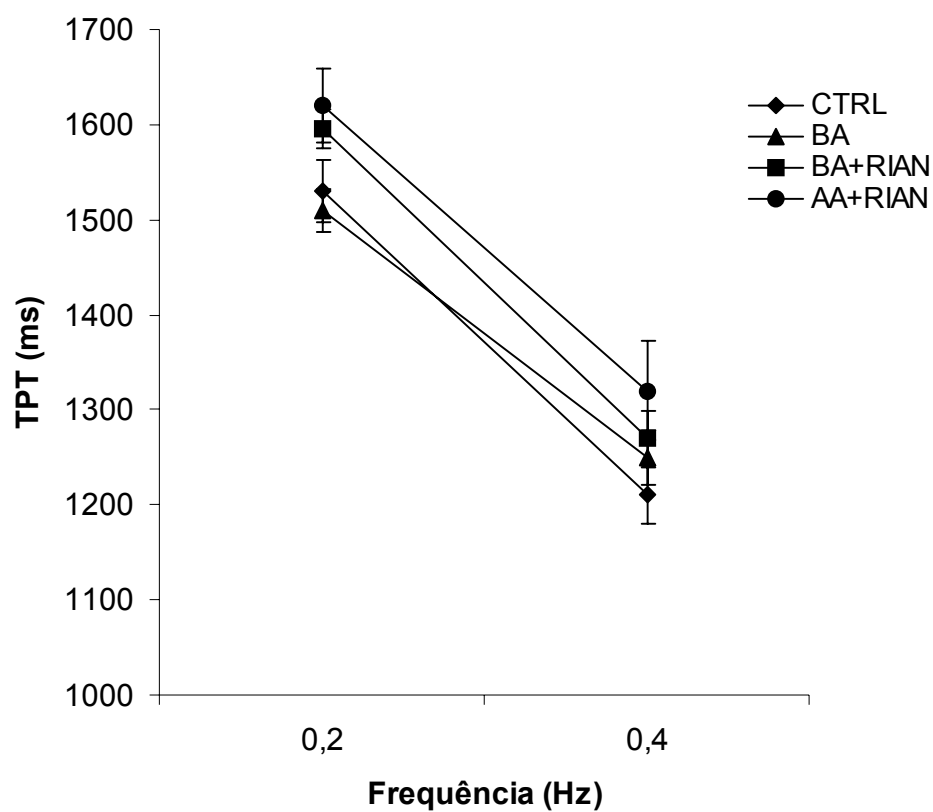


Figura 16. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para o pico de tensão (TPT - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 15 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M.

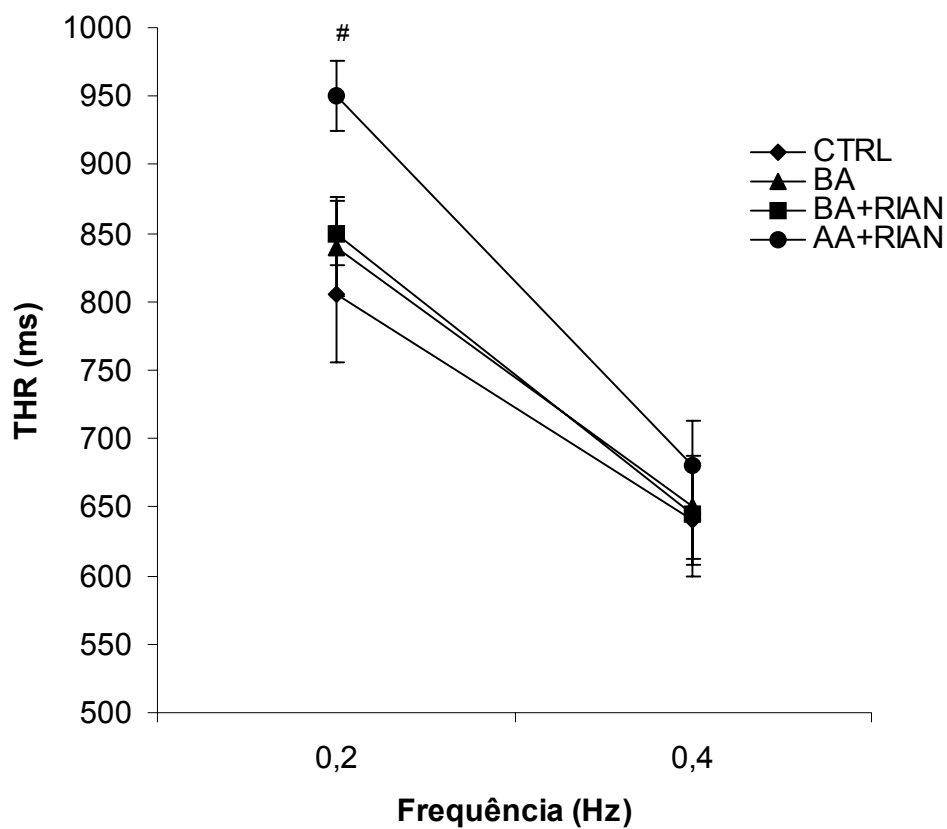


Figura 17. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 15 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) é indicada pelo símbolos: # - BA+RIAN x AA+RIAN.

#### 4.2.4.2. Relação Força-Frequência à 25 °C

A Tabela 9 apresenta os valores médios da força de contração ( $F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ), do tempo para a pico de tensão (TPT – ms) e do tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares isoladas de *S. marmoratus* (n=10) quando expostos a temperatura de 25 °C, obtidos durante aumentos progressivos na frequência de estimulação (Hz) em preparações controle (CTRL), concentração tônica de adrenalina – ou baixa adrenalina – (BA), baixa adrenalina e rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina e rianodina (AA+RIAN). Esses valores encontram-se graficamente representados nas figuras 18, 19 e 20.

A  $F_c$  obtida sob concentração tônica de adrenalina em cada frequência de estimulação testada não apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparada com os valores obtidos em preparações controle. Os parâmetros tempo-dependentes foram reduzidos significativamente após incrementos na frequência de estimulação a partir de 0,6 e 0,8 Hz para o TPT e THR respectivamente.

Após adição de rianodina, também não foi observada uma redução na  $F_c$  com incrementos na frequência de estimulação, sendo a frequência máxima atingida para este tratamento semelhante às demais preparações. A  $F_c$  foi reduzida significativamente ( $p < 0,05$ ) quando comparadas às preparações controle (BA) desde a frequência inicial (42,5 %) até 0,8 Hz (32 %). O TPT para esta situação é reduzido com o aumento da frequência a partir de 0,6 Hz, e não houve diferença significativa entre os valores obtidos para esta preparação, quando comparados à situação controle. O THR é reduzido com o aumento da frequência a partir de 1,0 Hz e não sofre redução significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados à situação controle (BA).

Com aumento da concentração de adrenalina para  $10^{-5}$  M, as preparações não apresentaram redução na força após os incrementos de frequência de estimulação, sendo que a frequência máxima suportada pelas tiras ventriculares também não foi prolongada, sendo mantida a 1,4 Hz. A adição de concentração máxima de adrenalina reverteu o efeito inotrópico negativo causado pela rianodina. Os valores de  $F_c$  foram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) maiores que os observados após o tratamento com rianodina nas frequências de estimulação até 0,6 Hz. Apesar da tendência a um aumento na  $F_c$ , em nenhuma frequência

---

de estimulação houve aumento de Fc quando comparado ao controle (BA). Como mostra a Tabela 9, o TPT sofre redução significativa ( $p < 0,05$ ) após incrementos na frequência a partir de 0,6 Hz. Quando comparados com preparações com rianodina, a alta estimulação adrenérgica causou aumento de TPT ( $p < 0,05$ ), da frequência inicial até 0,8 Hz. O THR (figura 20) seguiu o mesmo padrão de resposta apresentados para o TPT.

Tabela 9. Valores de força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações ( $n = 10$ ): Controle (CTRL –  $1,25 \text{ mM de Ca}^{2+}$ ); Baixa Adrenalina (BA –  $10^{-8} \text{ M}$ ); Baixa Adrenalina + Rianodina (BA+RIAN –  $10 \text{ }\mu\text{M}$ ); Alta Adrenalina + Rianodina (AA+RIAN –  $10^{-5} \text{ M}$ ) na temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Em negrito, valores diferentes significativamente ( $p < 0,05$ ) dos obtidos inicialmente.

Tratamento	Frequência (Hz)							
		0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4
CTRL	$F_c$ ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	17,5 $\pm 1,6$	17,0 $\pm 1,6$	16,5 $\pm 1,7$	14,9 $\pm 1,8$	12,7 $\pm 2,2$	11,3 $\pm 2,3$	<b>8,5</b> $\pm 1,3$
	TPT (ms)	728 $\pm 18$	<b>647</b> $\pm 14$	<b>594</b> $\pm 9$	<b>545</b> $\pm 7$	<b>482</b> $\pm 6$	<b>420</b> $\pm 9$	<b>360</b> $\pm 5$
	THR (ms)	370 $\pm 25$	343 $\pm 23$	321 $\pm 25$	<b>280</b> $\pm 14$	<b>230</b> $\pm 6$	<b>197</b> $\pm 5$	<b>156</b> $\pm 4$
BA	$F_c$ ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	17,9 $\pm 0,6$	17,4 $\pm 0,8$	17,2 $\pm 0,9$	15,5 $\pm 1,3$	14,0 $\pm 2,0$	12,4 $\pm 2,0$	11,3 $\pm 1,6$
	TPT (ms)	775 $\pm 35$	703 $\pm 28$	<b>633</b> $\pm 20$	<b>555</b> $\pm 16$	<b>489</b> $\pm 9$	<b>417</b> $\pm 7$	<b>340</b> $\pm 9$
	THR (ms)	333 $\pm 23$	323 $\pm 23$	296 $\pm 22$	<b>270</b> $\pm 31$	<b>229</b> $\pm 8$	<b>188</b> $\pm 9$	<b>164</b> $\pm 6$
BA+RIAN	$F_c$ ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	10,3 $\pm 1,1$	10,7 $\pm 0,9$	11,1 $\pm 1,0$	10,6 $\pm 0,6$	9,4 $\pm 1,0$	6,8 $\pm 0,4$	4,9 $\pm 0,6$
	TPT (ms)	738 $\pm 33$	663 $\pm 34$	<b>605</b> $\pm 26$	<b>553</b> $\pm 17$	<b>489</b> $\pm 10$	<b>422</b> $\pm 9$	<b>360</b> $\pm 6$
	THR (ms)	308 $\pm 20$	293 $\pm 23$	275 $\pm 18$	261 $\pm 23$	<b>227</b> $\pm 13$	<b>175</b> $\pm 8$	<b>144</b> $\pm 6$
AA+RIAN	$F_c$ ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	21,1 $\pm 1,2$	20,5 $\pm 1,2$	19,2 $\pm 1,1$	16,4 $\pm 1,0$	14,4 $\pm 1,1$	12,9 $\pm 1,0$	12,0 $\pm 1,1$
	TPT (ms)	888 $\pm 21$	820 $\pm 17$	713 $\pm 9$	<b>625</b> $\pm 7$	<b>514</b> $\pm 8$	<b>431</b> $\pm 6$	<b>352</b> $\pm 9$
	THR (ms)	453 $\pm 38$	440 $\pm 23$	405 $\pm 15$	<b>315</b> $\pm 7$	<b>242</b> $\pm 7$	<b>174</b> $\pm 9$	<b>146</b> $\pm 8$

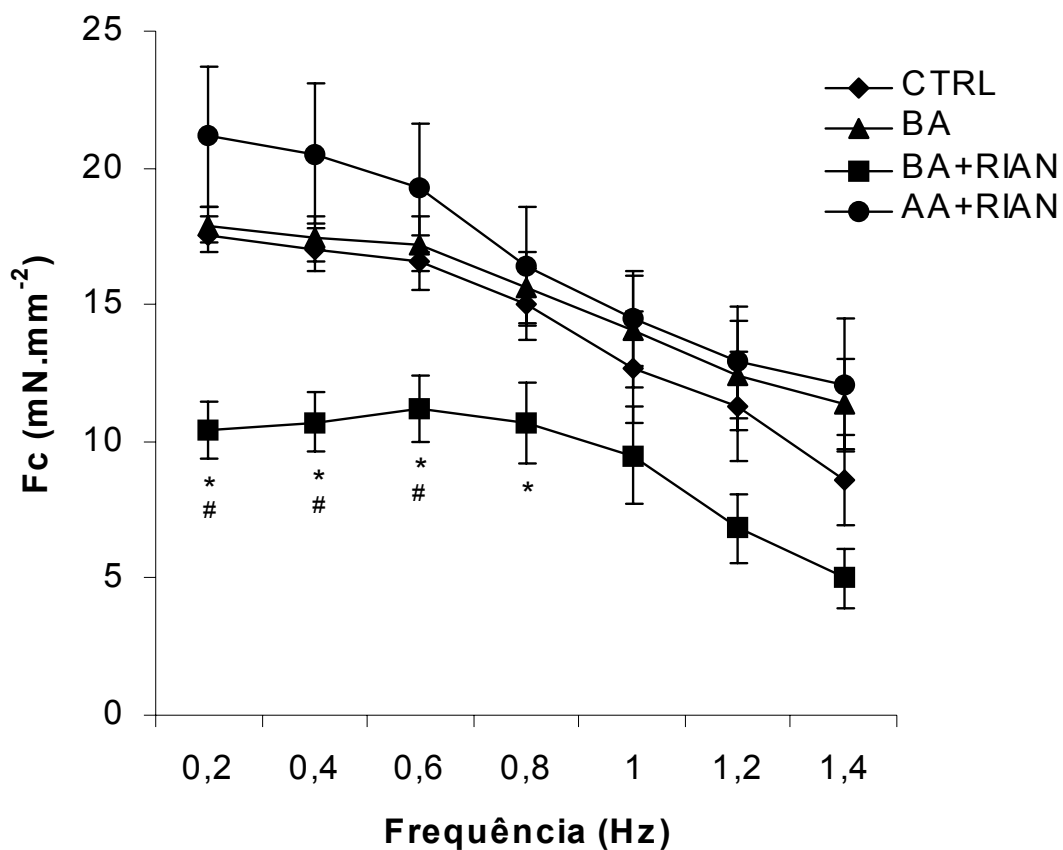


Figura 18. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre a força de contração ( $F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 25 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: \* - BA x BA+RIAN; # - BA+RIAN x AA+RIAN.



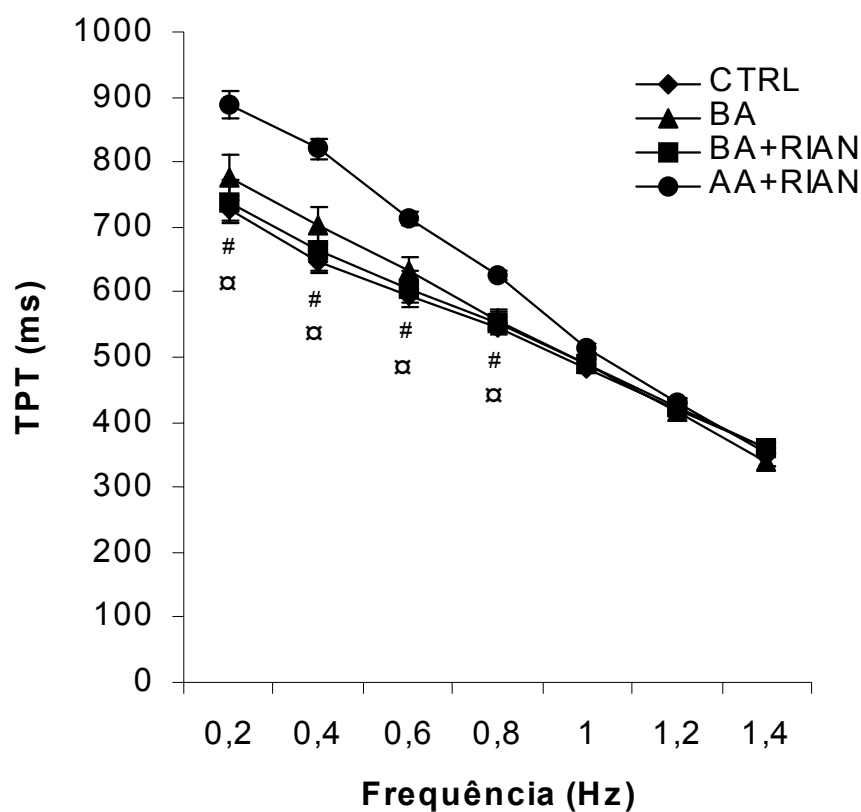


Figura 19. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para o pico de tensão (TPT - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 25 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: # - BA+RIAN x AA+RIAN;  $\alpha$  - AA+RIAN x BA

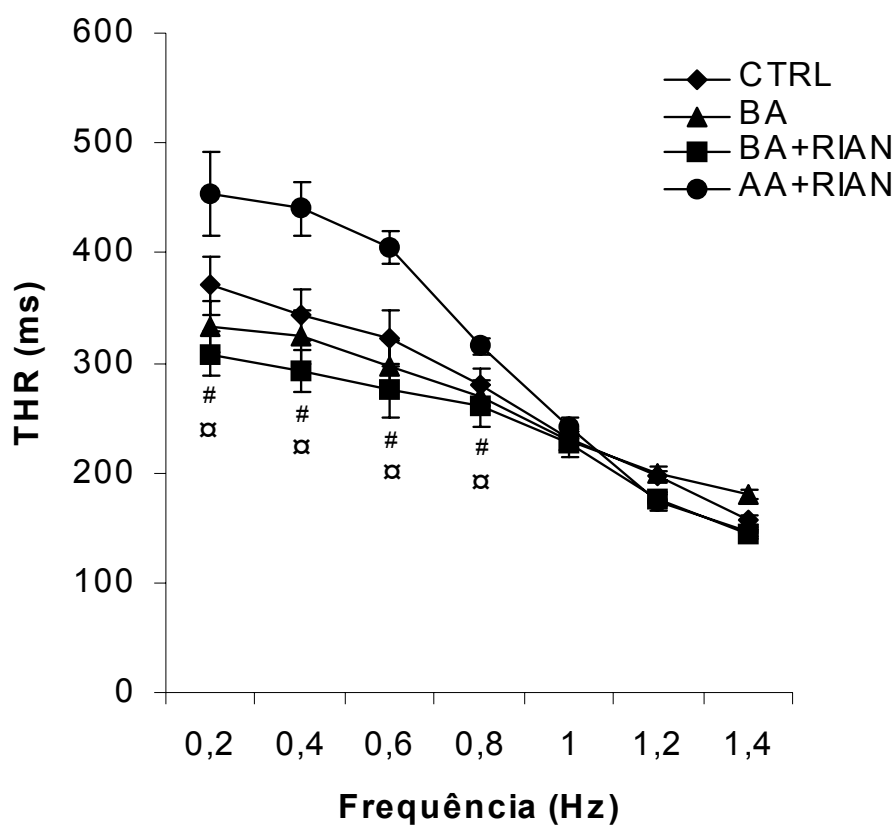


Figura 20. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 25 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: # - BA+RIAN x AA+RIAN;  $\alpha$  - AA+RIAN x BA

#### 4.2.4.3. Relação Força-Frequência à 35 °C

A Tabela 10 apresenta os valores médios da força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), do tempo para a pico de tensão (TPT – ms) e do tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares isoladas de *S. marmoratus* ( $n=10$ ) quando expostos a temperatura de 35 °C, obtidos durante aumentos progressivos na frequência de estimulação (Hz) em preparações controle (CTRL), concentração tônica de adrenalina – ou baixa adrenalina – (BA), baixa adrenalina e rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina e rianodina (AA+RIAN). Esses valores encontram-se graficamente representados nas figuras 21, 22 e 23.

As frequências máximas atingidas pelas tiras ventriculares permanecem as mesmas em todas as preparações.

Em preparações contendo BA houve redução na  $F_c$  ( $p < 0,05$ ) a partir da frequência de 1,2 Hz. O TPT sofre redução significativa ( $p < 0,05$ ) a partir da frequência de 1,0 Hz e o THR a partir de 1,2 Hz.

A aplicação de rianodina reduz a  $F_c$  somente à máxima frequência alcançada (2,0 Hz) quando comparada a  $F_c$  obtidas na frequência de estimulação inicial. Quando comparadas com preparações controle (BA), a  $F_c$  é reduzida pela rianodina desde a frequência inicial (43,6 %) até 1,2 Hz (24,4 %). O TPT para esta situação é reduzido com o aumento da frequência a partir de 0,8 Hz, e somente houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores obtidos para esta preparação, quando comparados à situação controle a partir de 1,6 Hz. O THR é reduzido com o aumento da frequência a partir de 1,2 Hz e não sofre redução significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados à situação controle (BA).

Após adição de concentração máxima de adrenalina, a redução significativa na  $F_c$  frente aos incrementos na frequência de estimulação foi observada a partir de 1,0 Hz. Houve aumento significativo na  $F_c$  quando comparado com tratamento com rianodina (BA+RIAN) nas frequências de estimulação inicial (84,5 %) até 1,2 Hz (29,7 %). Nesta temperatura, o TPT sofre redução significativa ( $p < 0,05$ ) após incrementos na frequência a partir de 1,0 Hz. Quando comparados com preparações com rianodina, a alta estimulação adrenérgica causou aumento de TPT ( $p < 0,05$ ), desde a frequência inicial até 1,2 Hz. O

THR sofreu redução após incrementos da frequência a partir de 0,8 Hz. Quando comparados com preparações com rianodina, a alta estimulação adrenérgica causou aumento de THR ( $p < 0,05$ ), desde a frequência inicial até 1,4 Hz. Não houve diferença quando comparados com as tiras controle (BA) em nenhuma frequência de estimulação.

#### 4.2.4.4. Comparações entre 15 x 25 x 35 °C

A figura 24 mostra comparações entre as preparações contendo BA nas 3 temperaturas experimentais de 15, 25 e 35 °C. A Fc diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) em todas as frequências testadas quando a temperatura do banho é alterada, quer seja aumentada (35 °C) ou diminuída (15 °C). Já os parâmetros tempo-dependentes, TPT (figura 25 A) e o THR (figura 25 B) sofrem se alteram significativas inversamente em relação à temperatura, ou seja, maiores valores para TPT e THR são obtidos em preparações expostas à menores temperaturas e vice versa. Estes resultados estão apresentados na tabela 11.

Após a adição de rianodina (figura 26) houve alteração significativa da força apenas a 15 °C, sendo que esses valores foram maiores que obtidos a 25 °C, devido a insensibilidade do tecido ventricular da espécie à rianodina em temperaturas baixas. Os parâmetros tempo-dependentes estão mostrados nas figuras 27A e 27B, e apresentaram os padrões de respostas similares aos observados em condições controle (BA). Os resultados obtidos após adição de rianodina estão mostrados na tabela 12.

Com a adição de alta concentração de adrenalina na presença de rianodina (figura 28), os valores obtidos recuperam os observados em situação controle, sendo que a maior Fc é observada em 25 °C, sendo significativamente maior somente aos valores obtidos em 35 °C. O TPT e o THR (figuras 29 A e 29 B) são significativamente alterados de modo inverso à temperatura em todas as frequências de estimulação testadas, sendo que o tempo para o pico máximo e para 50% do relaxamento são maiores quando maior for a temperatura e vice-versa. Esses resultados foram mostrados na tabela 13.

Tabela 10. Valores de força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações ( $n = 10$ ): Controle (CTRL –  $1,25 \text{ mM}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ ); Baixa Adrenalina (BA –  $10^{-8} \text{ M}$ ); Baixa Adrenalina + Rianodina (BA+RIAN –  $10 \text{ }\mu\text{M}$ ); Alta Adrenalina + Rianodina (AA+RIAN –  $10^{-5} \text{ M}$ ) na temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Em negrito, valores diferentes significativamente ( $p < 0,05$ ) dos obtidos inicialmente.

Tratamento	Frequência (Hz)										
		0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
CTRL	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	12,5 $\pm 0,8$	12,0 $\pm 0,8$	11,7 $\pm 0,7$	11,1 $\pm 0,7$	10,3 $\pm 0,7$	9,3 $\pm 0,9$	7,7 $\pm 0,9$	7,1 $\pm 0,6$	5,7 $\pm 0,5$	4,8 $\pm 0,4$
	TPT (ms)	421 $\pm 10$	405 $\pm 9$	<b>378</b> $\pm 10$	<b>364</b> $\pm 10$	<b>344</b> $\pm 11$	<b>322</b> $\pm 8$	<b>290</b> $\pm 6$	<b>275</b> $\pm 7$	<b>234</b> $\pm 4$	<b>214</b> $\pm 5$
	THR (ms)	246 $\pm 8$	230 $\pm 6$	220 $\pm 6$	<b>214</b> $\pm 6$	<b>202</b> $\pm 7$	<b>194</b> $\pm 7$	<b>186</b> $\pm 6$	<b>153</b> $\pm 6$	<b>137</b> $\pm 5$	<b>122</b> $\pm 3$
BA	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	12,5 $\pm 0,5$	12,3 $\pm 0,5$	11,9 $\pm 0,4$	11,3 $\pm 0,6$	10,5 $\pm 0,5$	9,7 $\pm 0,5$	<b>8,4</b> $\pm 0,9$	7,4 $\pm 0,6$	5,9 $\pm 0,4$	5,2 $\pm 0,8$
	TPT (ms)	378 $\pm 19$	362 $\pm 18$	332 $\pm 15$	318 $\pm 13$	312 $\pm 16$	<b>286</b> $\pm 13$	<b>272</b> $\pm 14$	<b>252</b> $\pm 12$	<b>220</b> $\pm 12$	<b>187</b> $\pm 10$
	THR (ms)	216 $\pm 8$	206 $\pm 6$	208 $\pm 9$	198 $\pm 8$	190 $\pm 8$	188 $\pm 7$	<b>168</b> $\pm 6$	<b>154</b> $\pm 8$	<b>137</b> $\pm 4$	<b>122</b> $\pm 3$
BA+RIAN	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	7,1 $\pm 0,4$	7,3 $\pm 0,4$	7,6 $\pm 0,4$	7,5 $\pm 0,6$	7,5 $\pm 0,4$	7,2 $\pm 0,5$	6,6 $\pm 0,8$	5,6 $\pm 0,3$	4,6 $\pm 0,6$	4,0 $\pm 0,5$
	TPT (ms)	352 $\pm 11$	350 $\pm 10$	334 $\pm 10$	326 $\pm 9$	<b>308</b> $\pm 9$	<b>300</b> $\pm 8$	<b>284</b> $\pm 6$	<b>274</b> $\pm 5$	<b>248</b> $\pm 3$	<b>232</b> $\pm 3$
	THR (ms)	192 $\pm 8$	190 $\pm 7$	189 $\pm 7$	183 $\pm 6$	174 $\pm 6$	170 $\pm 5$	<b>156</b> $\pm 4$	<b>142</b> $\pm 4$	<b>128</b> $\pm 4$	<b>118</b> $\pm 3$
AA+RIAN	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	13,0 $\pm 0,5$	12,9 $\pm 0,5$	12,6 $\pm 0,6$	11,9 $\pm 0,6$	10,8 $\pm 0,2$	<b>9,6</b> $\pm 0,8$	<b>8,0</b> $\pm 0,4$	7,3 $\pm 0,5$	5,8 $\pm 0,2$	5,0 $\pm 0,1$
	TPT (ms)	412 $\pm 19$	396 $\pm 20$	380 $\pm 20$	372 $\pm 17$	354 $\pm 16$	<b>333</b> $\pm 15$	<b>300</b> $\pm 12$	<b>273</b> $\pm 12$	<b>240</b> $\pm 13$	<b>206</b> $\pm 9$
	THR (ms)	226 $\pm 5$	218 $\pm 6$	212 $\pm 6$	212 $\pm 6$	<b>202</b> $\pm 5$	<b>198</b> $\pm 6$	<b>182</b> $\pm 5$	<b>155</b> $\pm 2$	<b>128</b> $\pm 3$	<b>120</b> $\pm 1$

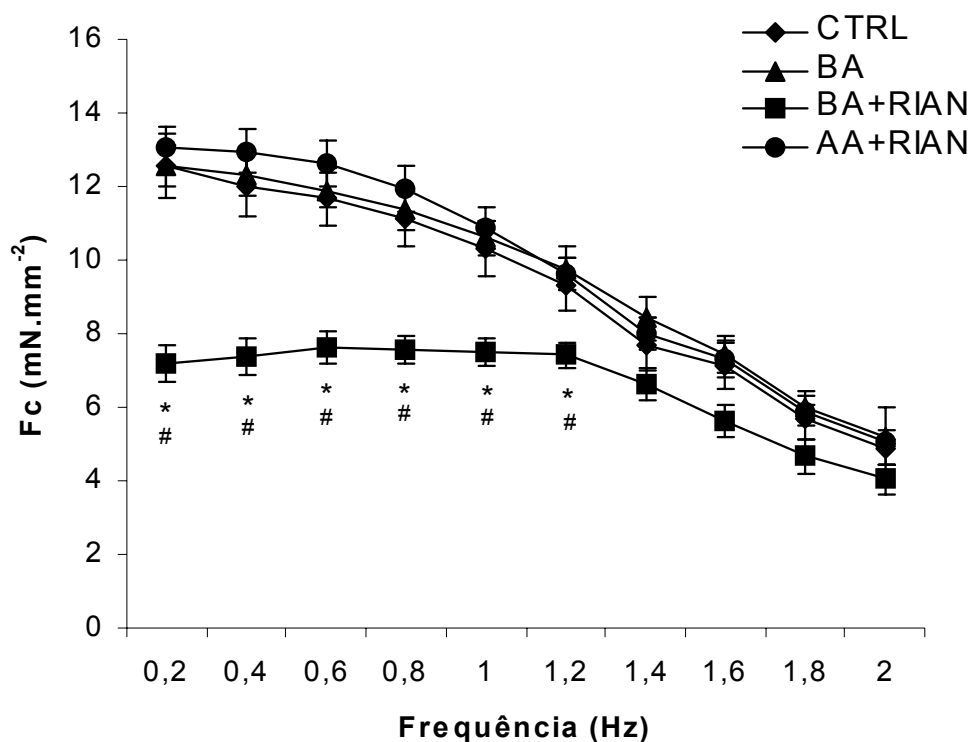


Figura 21. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre a força de contração ( $F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 35 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: \* - BA x BA+RIAN; # - BA+RIAN x AA+RIAN.

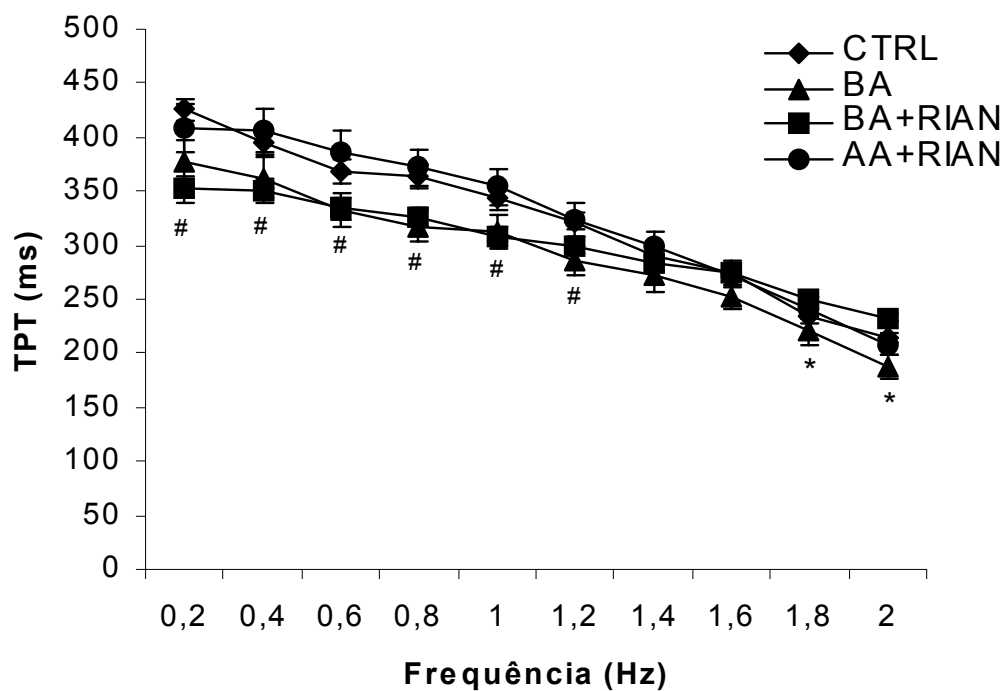


Figura 22. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para o pico de tensão (TPT - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 35 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: \* - BA x BA+RIAN; # - BA+RIAN x AA+RIAN.

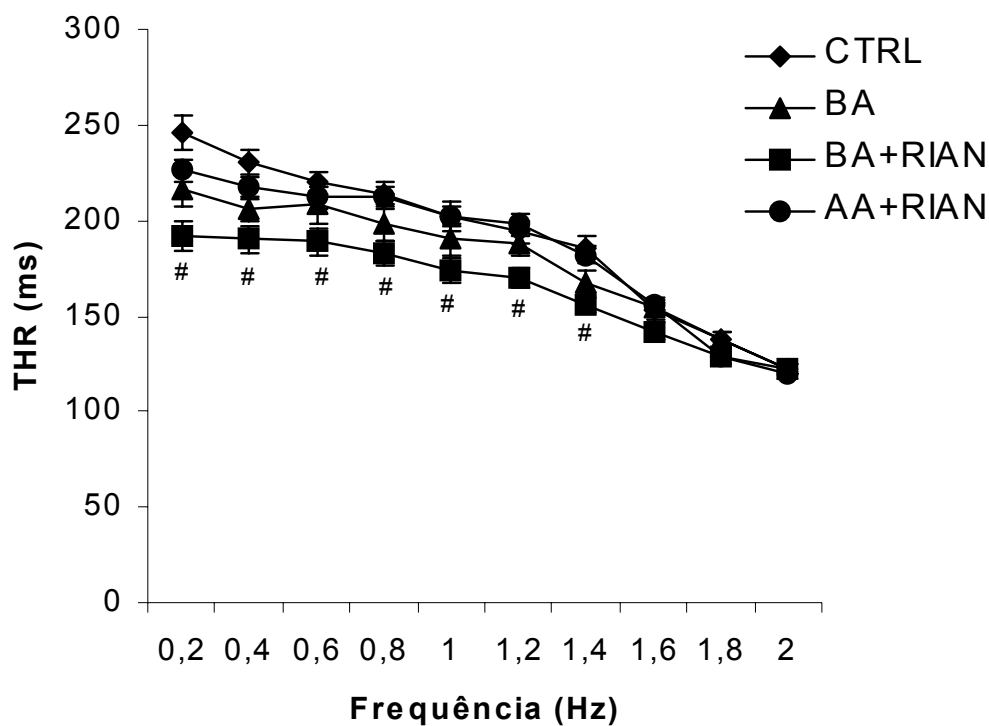


Figura 23. Diagrama comparativo entre as preparações controle (CTRL), baixa adrenalina (BA); baixa adrenalina + rianodina (BA+RIAN) e alta adrenalina + rianodina (AA+RIAN) sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* a 35 °C (n=10). Os pontos significam valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas pelos símbolos: # - BA+RIAN x AA+RIAN.



Tabela 11. Valores de força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações ( $n = 10$ ) contendo Baixa concentração de adrenalina ( $\text{BA} - 10^{-8}$  M) nas temperatura de 15, 25 e 35 °C. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M.

Temperatura	Frequência (Hz)										
		0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
15 °C	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	15,03 $\pm 0,8$	12,67 $\pm 1,1$								
	<b>TPT (ms)</b>	1510 $\pm 19$	1250 $\pm 30$								
	<b>THR (ms)</b>	840 $\pm 37$	650 $\pm 40$								
25 °C	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	17,9 $\pm 0,6$	17,4 $\pm 0,8$	17,2 $\pm 0,9$	15,5 $\pm 1,3$	14,0 $\pm 2,0$	12,4 $\pm 2,0$	11,3 $\pm 1,6$			
	<b>TPT (ms)</b>	775 $\pm 35$	703 $\pm 28$	633 $\pm 20$	555 $\pm 16$	489 $\pm 9$	417 $\pm 7$	340 $\pm 9$			
	<b>THR (ms)</b>	333 $\pm 23$	323 $\pm 23$	296 $\pm 22$	270 $\pm 31$	229 $\pm 8$	188 $\pm 9$	164 $\pm 6$			
35 °C	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	12,5 $\pm 0,5$	12,3 $\pm 0,5$	11,9 $\pm 0,4$	11,3 $\pm 0,6$	10,5 $\pm 0,5$	9,7 $\pm 0,5$	8,4 $\pm 0,9$	7,4 $\pm 0,6$	5,9 $\pm 0,4$	5,2 $\pm 0,8$
	<b>TPT (ms)</b>	378 $\pm 19$	362 $\pm 18$	332 $\pm 15$	318 $\pm 13$	312 $\pm 16$	286 $\pm 13$	272 $\pm 14$	252 $\pm 12$	220 $\pm 12$	187 $\pm 10$
	<b>THR (ms)</b>	216 $\pm 8$	206 $\pm 6$	208 $\pm 9$	198 $\pm 8$	190 $\pm 8$	188 $\pm 7$	168 $\pm 6$	154 $\pm 8$	137 $\pm 4$	122 $\pm 3$

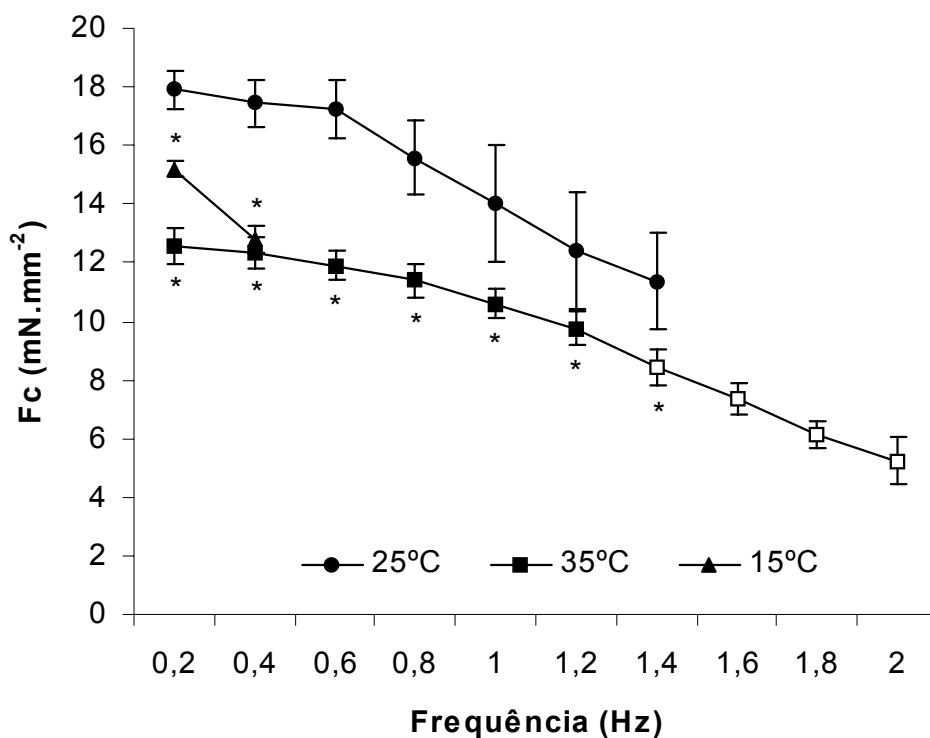


Figura 24. Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre a força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo baixa concentração de adrenalina ( $10^{-8}$  M). Os pontos representam os valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à 25 °C.

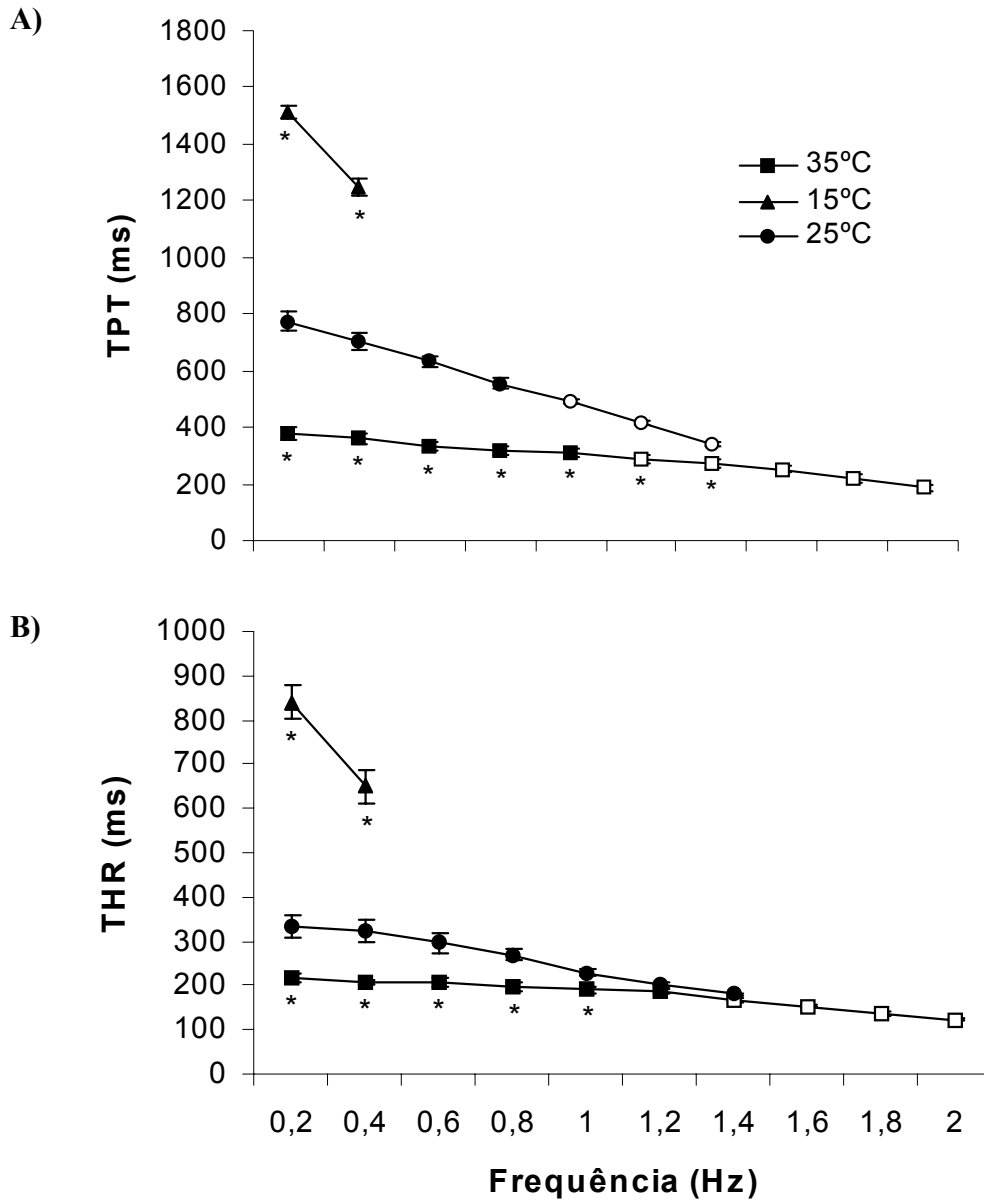


Figura 25. Efeito do aumento da freqüência de estimulação (Hz) sobre os parâmetros tempo-dependentes A) TPT e B) THR ( ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo baixa concentração de adrenalina ( $10^{-8}$  M). Os pontos representam os valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à 25 °C.

Tabela 12. Valores de força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações ( $n = 10$ ) contendo Baixa concentração de adrenalina ( $\text{BA} - 10^{-8}$  M) mais Rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ) nas temperatura de 15, 25 e 35 °C. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M.

Temperatura	Frequência (Hz)										
		0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
15 °C	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	13,97 $\pm 0,9$	12,16 $\pm 1,0$								
	<b>TPT (ms)</b>	1595 $\pm 21$	1245 $\pm 29$								
	<b>THR (ms)</b>	830 $\pm 25$	645 $\pm 38$								
25 °C	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	10,3 $\pm 1,1$	10,7 $\pm 0,9$	11,1 $\pm 1,0$	10,6 $\pm 0,6$	9,4 $\pm 1,0$	6,8 $\pm 0,4$	4,9 $\pm 0,6$			
	<b>TPT (ms)</b>	738 $\pm 33$	663 $\pm 34$	605 $\pm 26$	553 $\pm 17$	489 $\pm 10$	422 $\pm 9$	360 $\pm 6$			
	<b>THR (ms)</b>	308 $\pm 20$	293 $\pm 23$	275 $\pm 18$	261 $\pm 23$	227 $\pm 13$	175 $\pm 8$	144 $\pm 6$			
35 °C	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	7,1 $\pm 0,4$	7,3 $\pm 0,4$	7,6 $\pm 0,4$	7,5 $\pm 0,6$	7,5 $\pm 0,4$	7,2 $\pm 0,5$	6,6 $\pm 0,8$	5,6 $\pm 0,3$	4,6 $\pm 0,6$	4,0 $\pm 0,5$
	<b>TPT (ms)</b>	352 $\pm 11$	350 $\pm 10$	334 $\pm 10$	326 $\pm 9$	308 $\pm 9$	300 $\pm 8$	284 $\pm 6$	274 $\pm 5$	248 $\pm 3$	232 $\pm 3$
	<b>THR (ms)</b>	192 $\pm 8$	190 $\pm 7$	189 $\pm 7$	183 $\pm 6$	174 $\pm 6$	170 $\pm 5$	156 $\pm 4$	142 $\pm 4$	128 $\pm 4$	118 $\pm 3$

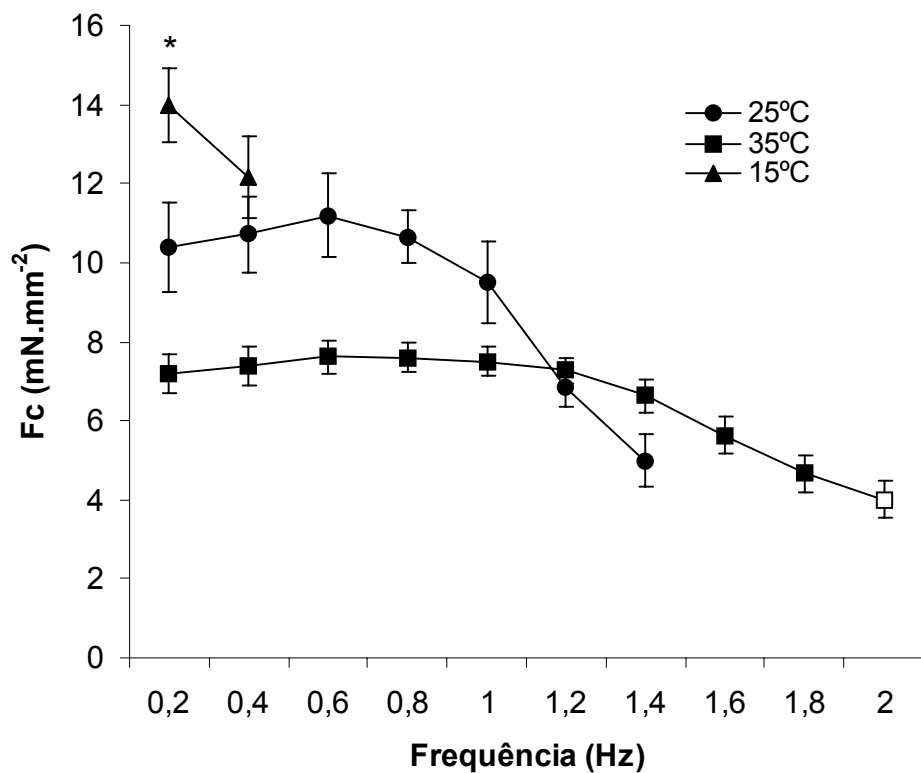


Figura 26. Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre a força de contração ( $F_c$  –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo baixa concentração de adrenalina ( $10^{-8}$  M) mais rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ). Os pontos representam os valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à 25 °C.

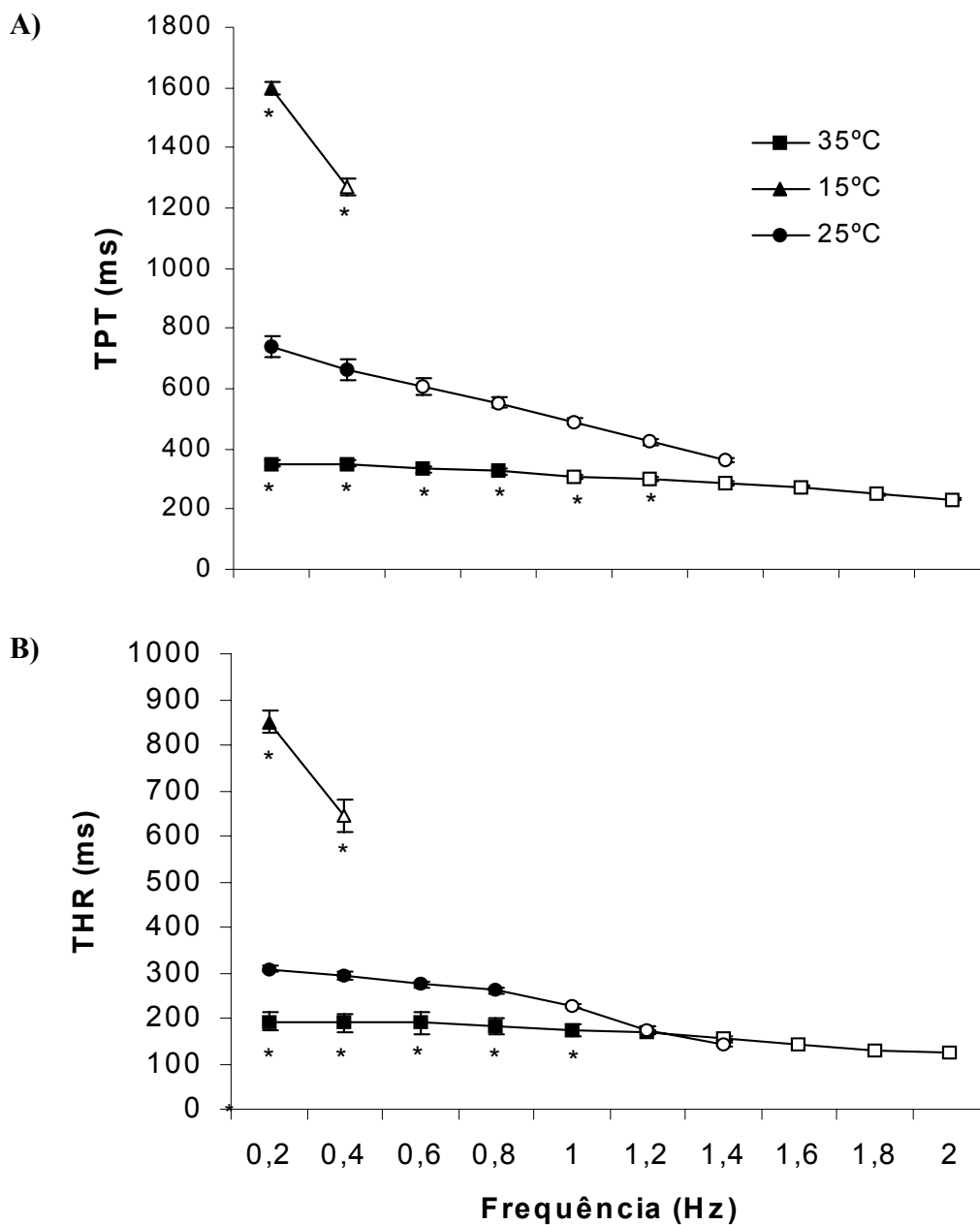


Figura 27. Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre os parâmetros tempo-dependentes A) TPT e B) THR (ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo baixa concentração de adrenalina ( $10^{-8}$  M) mais Rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ). Os pontos representam os valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à  $25^\circ\text{C}$ .

Tabela 13. Valores de força de contração ( $F_c - \text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) e dos tempos para atingir o pico máximo de tensão (TPT - ms) e para atingir 50% do relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de *S. marmoratus* em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação em preparações ( $n = 10$ ) contendo Alta concentração de adrenalina ( $AA - 10^{-5} \text{ M}$ ) mais Rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ) nas temperatura de 15, 25 e 35 °C. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M.

Temperatura	Frequência (Hz)										
		0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
15 °C	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	15,68 $\pm 0,8$	13,1 $\pm$ 0,9								
	<b>TPT (ms)</b>	1680 $\pm 40$	1360 $\pm 38$								
	<b>THR (ms)</b>	950 $\pm 26$	680 $\pm 35$								
25 °C	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	21,1 $\pm 1,2$	20,5 $\pm 1,2$	19,2 $\pm 1,1$	16,4 $\pm 1,0$	14,4 $\pm 1,1$	12,9 $\pm 1,0$	12,0 $\pm 1,1$	21,1 $\pm 1,2$	20,5 $\pm 1,2$	19,2 $\pm 1,1$
	<b>TPT (ms)</b>	888 $\pm 21$	820 $\pm 17$	713 $\pm 9$	625 $\pm 7$	514 $\pm 8$	431 $\pm 6$	352 $\pm 9$	888 $\pm 21$	820 $\pm 17$	713 $\pm 9$
	<b>THR (ms)</b>	453 $\pm 38$	440 $\pm 23$	405 $\pm 15$	315 $\pm 7$	242 $\pm 7$	174 $\pm 9$	146 $\pm 8$	453 $\pm 38$	440 $\pm 23$	405 $\pm 15$
35 °C	<b>Fc</b> ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	13,0 $\pm 0,5$	12,9 $\pm 0,5$	12,6 $\pm 0,6$	11,9 $\pm 0,6$	10,8 $\pm 0,2$	9,6 $\pm 0,8$	8,0 $\pm 0,4$	7,3 $\pm 0,5$	5,8 $\pm 0,2$	5,0 $\pm 0,1$
	<b>TPT (ms)</b>	412 $\pm 19$	396 $\pm 20$	380 $\pm 20$	372 $\pm 17$	354 $\pm 16$	333 $\pm 15$	300 $\pm 12$	273 $\pm 12$	240 $\pm 13$	206 $\pm 9$
	<b>THR (ms)</b>	226 $\pm 5$	218 $\pm 6$	212 $\pm 6$	212 $\pm 6$	202 $\pm 5$	198 $\pm 6$	182 $\pm 5$	155 $\pm 2$	128 $\pm 3$	120 $\pm 1$

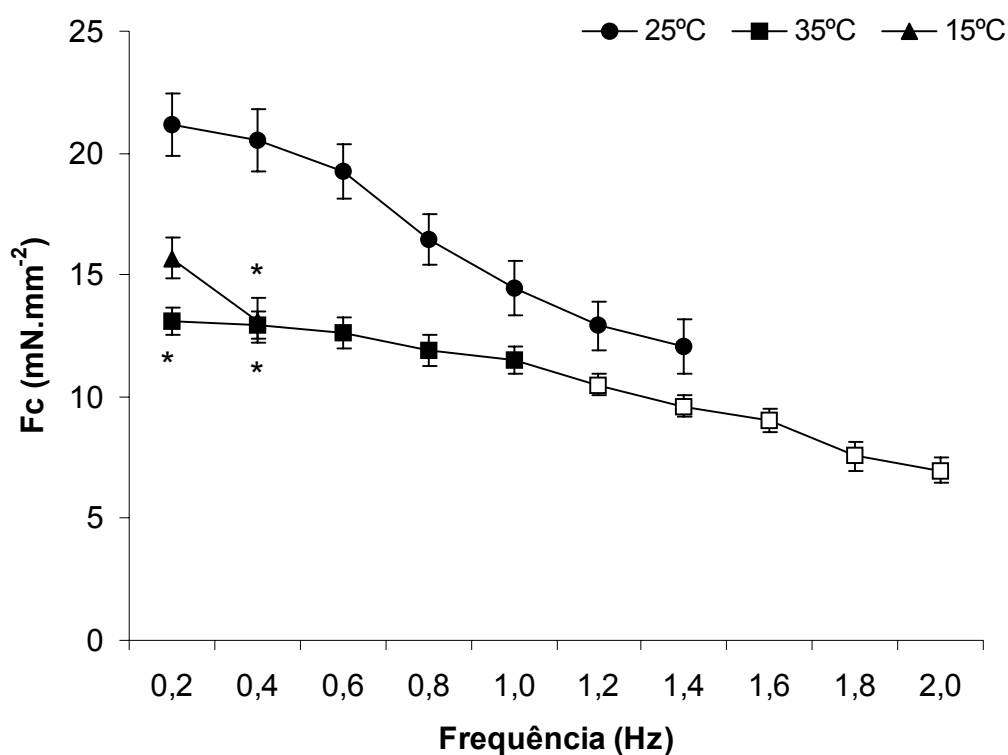


Figura 28. Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre a força de contração ( $F_c - \text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo alta concentração de adrenalina ( $10^{-5}$  M) mais rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ). Os pontos representam os valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à 25 °C.



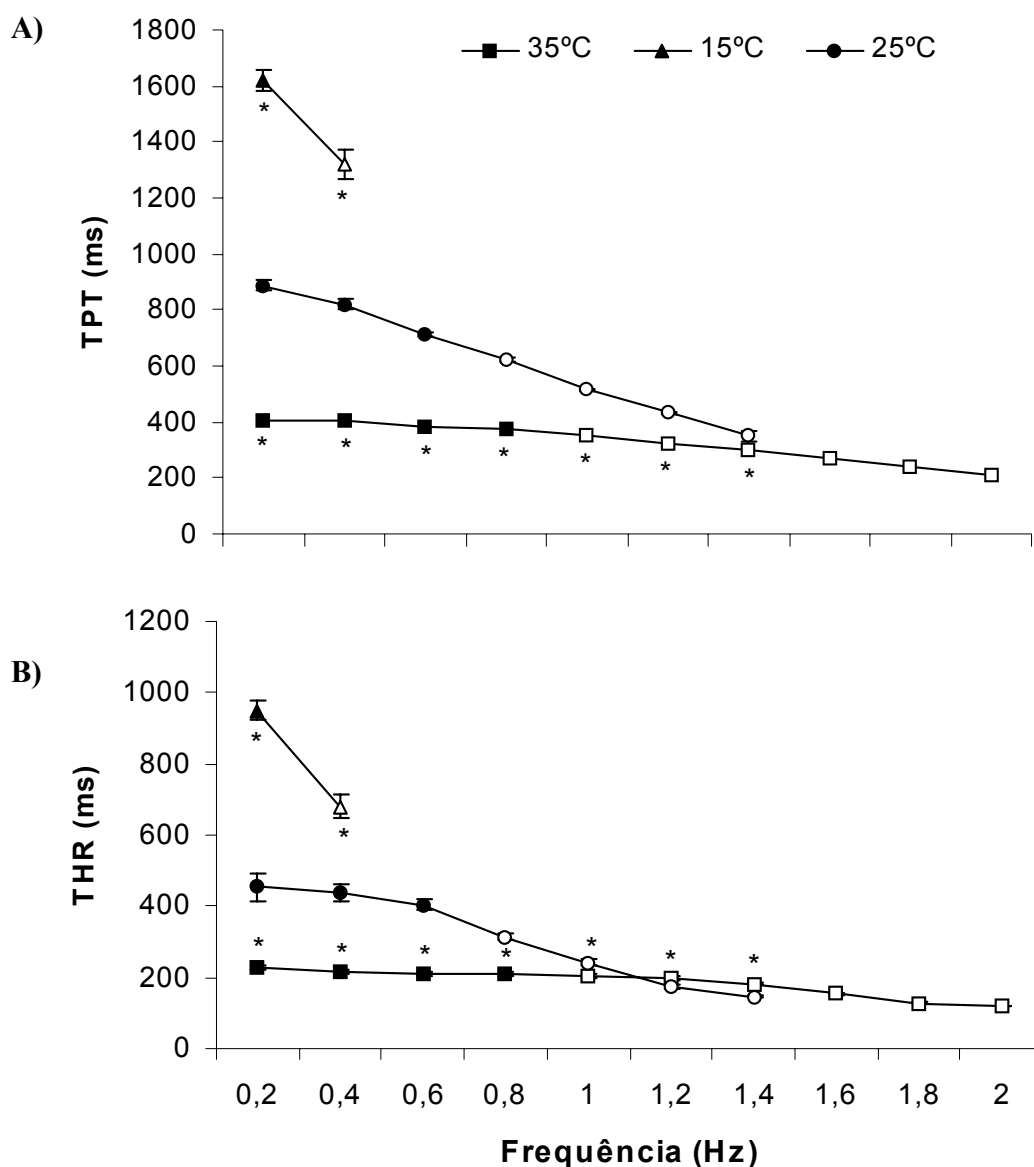


Figura 29. Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre os parâmetros tempo-dependentes A) TPT e B) THR (ms) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* em preparações contendo alta concentração de adrenalina ( $10^{-5}$  M) mais Rianodina ( $10 \mu\text{M}$ ). Os pontos representam os valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Símbolos abertos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos à  $25^\circ\text{C}$ .

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Efeito da temperatura sobre a frequência cardíaca *in vivo*

O débito cardíaco deve ser regulado para manter um adequado fluxo de sangue para músculos em exercícios, cérebro e outros tecidos sob uma variedade de condições. Durante a elevação na temperatura, a taxa cardíaca e velocidade de contração cardíaca são aumentadas, ao passo que a força de contração é freqüentemente deprimida (VORNANEN, 1989; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; HOVE-MADSEN, 1992; KEEN et al., 1994). Como consequência da mudança na força de contração e frequências, a capacidade de bombeamento (débito cardíaco) do coração de peixes é diminuída em temperaturas extremas e geralmente otimizada em temperaturas fisiológicas (MATIKAINEN & VORNANEN, 1992; SHIELS & FARRELL, 1997).

Na maioria dos peixes, esta regulação do débito cardíaco é mediada por alterações no volume sistólico ao invés de dar-se, como nos mamíferos, pelo controle da frequência cardíaca (FARRELL, 1991). Por outro lado, RANDALL (1968) aponta um aumento no débito cardíaco de peixes quase totalmente devido a uma elevação na frequência cardíaca ( $f_H$ ). VORNANEN (1994) estudando a carpa cruciana, *Carassius carassius*, verificou que esta espécie aumenta a  $f_H$  em temperaturas elevadas, enquanto que ocorre um aumento do volume sistólico em baixas temperaturas.

Segundo LAURENT et al. (1983), a  $f_H$  de teleósteos é determinada pela taxa intrínseca de despolarização das células marcapasso, que se localizam no seio venoso, e por seu controle extrínseco, pelo sistema nervoso autônomo, do volume sistólico. Além disso, a temperatura tem um alto grau de envolvimento com a ritmicidade cardíaca dos teleósteos (HARPER et al., 1995).

Por meio de registros eletrocardiográficos dos batimentos cardíacos de *S. marmoratus*, determinou-se, no presente estudo, a contribuição dos componentes intrínsecos e extrínsecos nas alterações agudas de temperatura.

De acordo com DRIEDZIC & GESSER (1994), os valores de frequência cardíaca comumente encontradas em teleósteos e elasmobrânquios estão entre 10 e 60 bpm, não ultrapassando 120 bpm. Podem ser encontradas algumas exceções para este padrão em peixes muito ativos como em atum, *Katsuwonus pelamis*, que apresenta  $f_H$  em repouso em torno de 120 bpm, podendo chegar até 200 bpm quando em exercício (KENN et al., 1992),

e no teleósteo marinho *B. saporator*, cuja  $f_H$  em repouso é de 140 e 225 bpm a 25 e 35 °C respectivamente (RANTIN et al., 1998).

Em relação às espécies já estudadas, a  $f_H$  de *S. marmoratus* encontra-se dentro da faixa comumente exibida pela maioria dos teleósteos, com valores médios de  $12,6 \pm 0,8$  bpm a 15 °C,  $31,1 \pm 1$  bpm a 25 °C e  $50,5 \pm 1,9$  bpm a 35 °C.

Com os resultados obtidos, podemos classificar a espécie como bem adaptada a enfrentar variações agudas na temperatura ambiental da magnitude das impostas no presente trabalho, uma vez que a  $f_H$  obtida após o retorno subsequente à temperatura de aclimação recuperou os valores obtidos inicialmente, não havendo diferença significativa tanto após a diminuição aguda quanto após o aumento agudo da temperatura.

Dessa forma, pode-se inferir que *S. marmoratus* utiliza-se de ajustes cronotrópicos para garantir a performance cardíaca adequada em variação de temperatura. Tais ajustes parecem ser prioritários uma vez que, nos experimentos *in vitro*, verificou-se um significativo efeito inotrópico negativo nas tiras ventriculares tanto expostas a temperaturas superiores (35 °C) quanto inferiores (15 °C) à temperatura de aclimação, que serão discutidos abaixo.

De acordo com FARRELL et al. (1996), o estudo exclusivo da  $f_H$  não é suficiente para elucidar os mecanismos de ajustes cardiovasculares em função da temperatura, uma vez que a regulação do débito cardíaco pode depender também de alterações no volume sistólico.

Assim sendo, é evidente a importância da investigação das respostas inotrópicas da espécie, por meio de estudos *in vitro* da força de contração isométrica das tiras ventriculares submetidas a alterações da temperatura.

## **5.2. Respostas cardíacas *in vitro***

### **5.2.1. Efeito do Tempo de Exposição**

A exposição do miocárdio ventricular de *S. marmoratus* por 40 minutos de estimulação contínua não causou redução na força de contração em situação controle

(concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  fisiológica – 1,25 mM), em nenhuma das temperaturas experimentais testadas.

Isto prova que uma suposta ocorrência de redução ou aumento na Fc em alguma das situações experimentais testadas, esta estritamente relacionada à situação fisiológica ou farmacológica empregada para realização dos experimentos.

### **5.2.2. Aumento da disponibilidade de $\text{Ca}^{2+}$ extracelular**

CHAPMAN (1983), descreve que a força de contração cardíaca pode ser modificada por meio de alterações nas propriedades de ligação das proteínas contráteis ao cálcio. Tal efeito pode ser obtido, por exemplo, pela ação de catecolaminas e também pela variação da quantidade de cálcio disponível. Vários sistemas estão envolvidos com o fornecimento e retirada de cálcio do sarcoplasma: a bomba de cálcio e os canais de rianodina, os canais tipo L e o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  da sarcolema e ainda, uma possível ação indireta da mitocôndria e da bomba de cálcio da sarcolema.

O aumento da força de contração obtido após incrementos do cálcio extracelular mimetiza a estimulação adrenérgica, uma vez que também aumenta a oferta de cálcio aos miofilamentos, facilitando a performance cardíaca (BAILEY & DRIEDZIC, 1990). Entretanto, elevações crescentes do cálcio extracelular parecem aumentar o influxo desde íon através da sarcolema sem alteração de qualquer via de transdução de sinal e não exercem os efeitos lusitrópicos positivos, ao contrário do ocorrido com estimulação adrenérgica (SHIELS & FARREL, 1997). Tais incrementos de cálcio extracelular evidenciam os possíveis efeitos do maior influxo de cálcio sobre o TPT e o inotropismo cardíaco por aumentos diretos das quantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador (COYNE et al., 2000).

A contração dos cardiomiócitos é iniciada pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da sarcolema, o qual estimula os miofilamentos diretamente, e/ou a liberação de cálcio cálcio-induzida, pela abertura dos canais do retículo sarcoplasmático (FABIATO, 1983; VORNANEN et al., 2002; FRANK et al., 2003). A importância relativa dessas duas rotas de fornecimento de íons cálcio parece variar de acordo com as diferentes organizações taxonômicas. Recentes estudos indicam que os cardiomiócitos de atuns dependem em maior escala do cálcio intracelular do que outros teleósteos, nos quais o cálcio extracelular

regula a contratilidade (SHIELS et al., 1999). A importância de tal diferença encontrada em atum é desconhecida, mas parece estar relacionada ao elevado grau de atividade da espécie, impondo uma maior demanda contrátil ao coração. Os níveis sanguíneos de cálcio variam muito entre as diferentes espécies de atuns, podendo influenciar diferentemente a contratilidade cardíaca (SATHER & ROGERS, 1967; COOPER et al., 1994).

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L da sarcolema, também chamados de receptores de dihidropiridinas, estão localizados primariamente nas junções sarcolemas, junto aos receptores de rianodina do RS, onde ocorre o fenômeno de liberação de cálcio cálcio-induzida (BERS, 2002). Segundo KIM et al. (2000), a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através da sarcolema é primariamente dependente desses canais de cálcio do tipo L. Sendo assim, a importância desta rota de tomada de cálcio foi determinada pela alteração da concentração de cálcio extracelular.

Vários estudos têm demonstrado que a contratilidade cardíaca da maioria dos peixes é dependente da concentração de cálcio extracelular, refletindo assim, a importância desta rota (via canais L da sarcolema) para o acoplamento E-C (DRIEDZIC & GESSER, 1994; TIBBITS et al., 1992b; VORNANEN, 1996b; COYNE et al., 2000). A elevação da força de contração, em virtude dos incrementos nos níveis extracelulares de cálcio, sugere grande dependência da performance cardíaca por esta oferta, em detrimento das reservas intracelulares. No entanto, devemos levar em consideração a liberação de cálcio cálcio-induzida, que ocorre através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (canais de rianodina).

De acordo com BERS, (2001) e EISNER, (1998), intervenções que levem a aumentos na concentração de cálcio intracelular como, por exemplo, os incrementos no  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, podem aumentar a Fc. Porém, não há como se definir prontamente o quanto esse efeito é devido apenas ao aumento do cálcio intracelular, ao aumento na fração do  $\text{Ca}^{2+}$  liberada pelo RS ou mesmo ao aumento na retomada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS. Além disso, segundo VORNANEN (1997), a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula via canais L da sarcolema também atua na manutenção do platô do potencial de ação cardíaco, proporcionando o influxo transsarcolemal de cálcio por outros canais voltagem dependentes, como os trocadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Dessa forma, é preciso considerar todos esses fatores como, por exemplo, o efeito do bloqueio dos canais de cálcio de RS na força de contração.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o cálcio extracelular não é um fator limitante para a contratilidade cardíaca da espécie tanto na temperatura de aclimação (25 °C) quanto em baixas temperaturas (15 °C), uma vez que a elevação do mesmo não produziu nenhum efeito significativo na Fc. Por outro lado, a Fc aumentou significativamente a 35 °C, indicando a importância do influxo de cálcio através da sarcolema para o acoplamento E-C em temperaturas elevadas. KIM et al. (2000), trabalhando com cardiomiócitos isolados de truta, descreveram uma diminuição da utilização de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular por esta espécie, quando testados em temperaturas inferiores à temperatura de aclimação. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais L diminuiu consideravelmente com a diminuição da temperatura, fornecendo subsídios para aceitar que em baixas temperaturas os cardiomiócitos de truta recebem suprimento de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques intracelulares, especificamente o RS, resposta esta já descrita por SHIELS & FARRELL, (1997). Adicionalmente, COYNE et al. (2000), descreveram uma grande diminuição da sensibilidade dos miofilamentos de truta ao  $\text{Ca}^{2+}$  em baixas temperaturas (4 °C) em relação à temperatura de aclimação (10 °C), uma resposta também descrita para rãs e coelhos por HARRISON & BERS (1989, 1990).

A ausência de resposta ao  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular apresentada por *S. marmoratus* difere do padrão descrito para a maioria das espécies de peixes, nos quais a contratilidade cardíaca é dependente da concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , refletindo assim, a importância dos movimentos transsarcolemais de  $\text{Ca}^{2+}$  para o acoplamento E-C cardíaco (TIBBITS et al., 1992a; DRIEDZIC & GESSER, 1994; VORNANEN, 1996a). Em diversas espécies de elasmobrânquios e teleósteos, dentre elas *Alosa pseudoharengus*, *Bathygobius soporator*, *Cyclopterus lumpus*, *Hemitripterus americanus*, *Katsuwonus pelamis*, *Lophius americanus*, *Macrozoarce americanus*, *Myxocephalus octodecimspinosus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis niloticus*, *Salmo solar*, *Scomber scombrus*, *Anguilla rostrata*, *Piaractus mesopotamicus*, a força isométrica máxima desenvolvida por suas tiras ventriculares aumenta significativamente após elevações das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelulares de 1 para 7 ou 9 mM ( DRIEDZIC & GESSER, 1985, 1988; KEEN et al., 1992; RANTIN et al., 1998; BAILEY et al., 2000; COYNE et al., 2000; COSTA et al., 2000; ANELLI Jr. et al., 2004; ).

Já o miocárdio de *S. marmoratus* assemelha-se aos padrões encontrados por HELLE (1983) para o peixe-bruxa, *Myxine glutinosa*, parecendo ser virtualmente inessível ao aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular tanto à temperatura de aclimação (25 °C) quanto em baixa temperatura (15 °C), sugerindo a existência de RS bem desenvolvido e funcional nessas temperaturas.

A importância do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para o desenvolvimento de força de contração cardíaca de *S. marmoratus* pôde ser evidenciada por concentrações crescentes de cálcio (de 1,25 até 11,25 mM) somente em 35 °C. Tais incrementos resultaram em aumento de força de contração de 105 %, quando atingida a concentração máxima, sendo que um efeito inotrópico positivo significativo foi detectado a partir de 3,25 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Cabe ressaltar que concentrações elevadas de cálcio não são encontradas no sangue em condições normais, mas podem ser desencadeadas pela liberação de adrenalina durante o estresse (OLLE, 2003) e por exercícios intensos (RUBEN & BENNETT, 1981), sugerindo que tais condições induzem aumentos na concentração de cálcio sanguínea, podendo ter um papel importante na regulação da contratilidade cardíaca.

Dessa forma, o aumento na Fc por incrementos na concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  revela uma maior dependência dessa fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  para a performance cardíaca somente quando a espécie se encontra em altas temperaturas. No entanto, a dependência do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular parece ocorrer independentemente da temperatura em algumas espécies como descrito por ANELLI JR et al. (2004), estudando o serrasalmideo neotropical *P. mesopotamicus*, o qual mostrou significativo aumento na Fc tanto em 25 quanto a 35 °C durante aumentos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. A mesma tendência foi registrada para *O. niloticus* (COSTA et al., 2000), em 25 e 40°C.

No presente estudo, a redução do TPT observada a 25 °C indica que o aumento da oferta de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular diminui o tempo para ativação contrátil, quer seja por ativação direta dos miofilamentos ou por ativação da liberação de cálcio cálcio-induzida do RS. Porém, o relaxamento não foi afetado, visto que o THR não muda significativamente, o qual indica eficientes mecanismos de extrusão  $\text{Ca}^{2+}$ , a despeito do aumento para níveis elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Por outro lado, o aumento do THR a 35 °C indica que a eficiência de extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  nessa temperatura foi prejudicada. O tempo máximo necessário para as fibras atingirem o grau máximo de Fc (TPT) não foi alterado a esta

temperatura em nenhuma concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular testada, a despeito do aumento na Fc. Juntos, estes dados apontam para uma possível funcionalidade do RS em temperatura de aclimatação ou mais elevadas.

### 5.2.3. Tensão pós-pausa

Potenciação pós-pausa reflete o mecanismo celular básico que controla a contração do músculo cardíaco (MILL et al., 1992). O desenvolvimento de força de contração do primeiro batimento após um período de pausa está relacionado com o preenchimento das reservas intracelulares de cálcio durante pausa diastólica não fisiológica e prolongada (COSTA et al., 2002).

Durante a pausa, o cálcio pode ser bombeado para fora da célula pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) e pode também ser estocado em compartimentos intracelulares tal como o RS. Como resultado, a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador dentro da celular é variável, dependendo das condições fisiológicas. Como a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  estocado pode aumentarem decorrência da pausa, a força da primeira contração após a mesma também pode aumentar. Dois fatores podem influenciar este processo: A duração do período de pausa e a funcionalidade do NCX (MILL et al., 1992). Além disso, diferentes espécies podem apresentar NCX com diferentes capacidades funcionais. BERS (2002) mostrou que o NCX foi responsável por retirar 28% do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador para promover o relaxamento de cardiomiócitos de ratos e apenas 7% do total da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador em coelhos.

O efeito da duração da pausa sobre a potenciação da Fc varia dependendo da espécie. No coração de alguns mamíferos, há potenciação da Fc após curtos períodos de pausa, a qual diminui quando o período de repouso é aumentado (VASSALLO & MILL, 1988). Por outro lado, em miocárdio de rato esta potenciação pós-pausa é mantida e se acentua mesmo após períodos longos de pausa (VASSALLO et al., 1990). COSTA et al. (2004), estudando o dipnóico *L. paradoxa*, verificaram que o aumento do período de repouso também resulta em redução da Fc. Aumentos da Fc após uma pausa diastólica prolongada foram observados em corações de elasmobrânquios, condizente com um relativo maior grau de desenvolvimento do RS dessas espécies quando comparados aos



teleósteos, no qual uma mínima potenciação pós-pausa da Fc é exibida (DRIEDZIC & GESSER, 1988).

Alguns estudos ultraestruturais sugerem a existência de grandes diferenças no grau de desenvolvimento do retículo sarcoplasmático (RS) do músculo cardíaco de diferentes espécies de peixes (HOCHACHKA & HULBERT, 1978; SANTER, 1985). Apesar dessas diferenças, o RS cardíaco de peixes é em geral menos desenvolvido anatomicamente e menos importante para o acoplamento E-C do que o RS de mamíferos. Em bacalhau, *Gadus virens*, por exemplo, o RS corresponde a 0,6% do volume do miócito, enquanto que em mamíferos estes valores variam de 3,5 a 7% do volume do miócito (HELLE, 1983; LEKNES, 1984). Embora haja pouca informação sobre vertebrados inferiores, alguns autores demonstraram que o RS é bem mais desenvolvido em dipnóicos e alguns teleósteos ativos como salmonídeos e scombrídeos (HOCHACHKA & HULBERT, 1978; KEEN et al, 1992) do que observados em anfíbios e agnatas (STALEY & BENSON, 1968; HELLE & STORESUND, 1975).

Como a maioria das espécies de vertebrados inferiores estudadas até o momento apresentam RS pouco desenvolvido anatomicamente e insensível a ação da rianodina, no que se refere à musculatura ventricular, o papel dessa organela como fornecedora de  $Ca^{2+}$  para o acoplamento E-C dessas espécies tem sido desconsiderado (THOMAS et al., 1996).

A significância do retículo sarcoplasmático (RS) no acoplamento E-C cardíaco varia grandemente entre as diversas classes de vertebrados, entre diferentes espécies de mesmo grupo filogenético e durante o desenvolvimento ontogenético do indivíduo. O RS é bem desenvolvido em cardiomiócitos de mamíferos e aves, onde é a maior fonte e reservatório de  $Ca^{2+}$  ativador. Em vertebrados ectotérmicos como os lagartos, rãs e peixes, assim como alguns mamíferos neonatos, o RS cardíaco é relativamente esparsa e a contração e o relaxamento são mais dependentes dos movimentos transsarcolemais de cálcio (FABIATO, 1983; BOSSEN & SOMMER, 1984; VORNANEN, 1996a,b).

A ocorrência de um RS funcional nas temperaturas em que os peixes são encontrados na natureza não é comum. Mesmo em espécies de peixes que possuem um RS relativamente bem desenvolvido estruturalmente, como truta arco-íris (HOVE-MADSEN, 1992; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; KEEN et al., 1994), o RS só apresenta papel importante como fornecedor de cálcio ao aparato contrátil quando exposto a

temperaturas supra-fisiológicas e/ou frequências de estimulação sub-fisiológicas. Além disso, a maior parte dos teleósteos já estudadas não apresentam RS funcional, dentre eles o bacalhau (*Gadus morhua*) a 10°C e o “sea raven”(*Hemitripterus americanus*) a 15 °C (DRIEDZIC & GESSER, 1988), o linguado (*Pleuronectes flesus* – HOVE-MADSEN & GESSER, 1989) a 15 °C e a carpa cruciana (VONANEN, 1996a) a 2 e 22°C. O mesmo padrão foi registrado para espécies de teleósteos tropicais como o amborê (*B. saporator* - RANTIN et al., 1998) e a tilápia do Nilo (*O. niloticus* - COSTA et al., 2000), tanto a 25 quanto a 40 °C, nos quais a existência de RS funcional seria bastante plausível no sentido de permitir que esses animais desenvolvessem uma resposta cardíaca condizente com o ambiente natural de ampla variação de temperatura em que se encontram.

Alguns estudos indicam sensibilidade do RS à rianodina apenas em temperaturas elevadas e frequências de estimulação não fisiológicas. É o caso da truta arco-íris, quando testada em altas temperaturas (a partir de 15 °C; KEEN et al., 1994) e baixas frequências (0,2 a 0,4 Hz; HOVE-MADSEN & GESSER, 1989; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; HOVE-MADSEN, 1992; SHIELS & FARRELL, 1997). Porém, ao contrário dos achados anteriores, estudos mais recentes têm demonstrado que o RS de truta é funcionalmente importante em frequências e temperaturas fisiológicas. Nessa espécie, a corrente de Ca<sup>2+</sup> dos canais L é insuficiente, em termos quantitativos, para ativar completamente a contração (HOVE-MADSEN, 1998, 2001). Em *Lota lota*, TIITU & VORNANEN (2002) observaram que o RS atrial e ventricular é sensível a rianodina, mesmo a 1°C, demonstrando a funcionalidade dessa organela como fornecedora de Ca<sup>2+</sup> para a contração independente da temperatura testada.

A rianodina foi incapaz de reduzir a Fc na maioria dos vertebrados ectotérmicos de clima temperado, sob condições fisiológicas mais relevantes, fato este que, de acordo com THOMAS et al. (1996), deve-se às menores temperaturas experimentais testadas. Estudos desenvolvidos com o atum, *Katsuwonus pelamis* (KEEN et al., 1992; TIBBITS, 1996), e a cavala, *Scomber japonicus* (SHIELS & FARRELL, 2000), indicam que a contratilidade cardíaca desses animais é substancialmente reduzida pela rianodina em tiras atriais e ventriculares em temperaturas superiores a 20°C, situação não observada em temperaturas experimentais mais baixas. Um padrão semelhante foi observado para *S. marmoratus* no

presente estudo, onde a rianodina reduziu significativamente a força de contração na temperatura de aclimação e a 35 °C, mas não teve efeito a 15 °C.

A ausência de resposta à rianodina pode ser resultado das temperaturas experimentais testadas. SHIELS & FARRELL (1997), por exemplo, verificaram que a resposta inotrópica negativa produzida pela rianodina no tecido ventricular de truta foi mais acentuada em exemplares aclimatados a 12 °C e submetidos a uma elevação aguda para 22 °C que em exemplares aclimatados a 22 °C. Isto mostra que um aumento da atividade do RS no acoplamento E-C representa uma estratégia adaptativa a uma elevação brusca da temperatura.

A observação de que mudanças agudas nas temperaturas, sobretudo elevações da mesma, causam um aumento na participação do RS como fornecedor de  $Ca^{2+}$  ao aparato contrátil, como demonstrado para truta, parece não se aplicar totalmente a espécies de peixes tropicais. No amborê (RANTIN et al., 1998) e na tilápia do Nilo (COSTA et al., 2000), que são espécies naturalmente sujeitas a mudanças agudas na temperatura ambiental diariamente, não foi observada sensibilidade à rianodina, nem na temperatura de aclimação (25 °C) e nem após elevação para 40°C.

Por meio de aplicação de rianodina, observou-se que o tecido ventricular de *S. marmoratus* difere da maioria dos peixes de ambiente temperado estudados até o momento. Os resultados obtidos sugerem que a contração ventricular desta espécie é também dependente dos estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$ , uma vez que a aplicação de rianodina causou desaparecimento da potenciação da força após o repouso a 25 °C e decaimento da força a 35 °C. A presença de um RS funcional em temperaturas nas quais a espécie é encontrada na natureza já havia sido descrita por KEEN et al. (1992), para tiras atriais de atum, TIITU & VORNANEN (2003) para o burbot, *Lota lota*. Porém, vale lembrar que o tecido atrial de várias espécies apresenta RS do átrio mais desenvolvido que no ventrículo (BERS, 2001).

Recentes estudos mostram outros teleósteos neotropicais com o mesmo padrão de resposta. ANELLI Jr et al (2004), estudando tiras ventriculares de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, encontraram uma potenciação pós-pausa de aproximadamente 140 % a 25 °C e de 135 % a 35 °C, sendo que a aplicação de 10  $\mu$ M de rianodina aboliu completamente tal potenciação em ambas as temperaturas. Resultado semelhante foi obtido por OLLE

(2003) para tiras ventriculares de traíra, *Hoplias malabaricus*, onde potenciações pós-pausa de aproximadamente 30 % a 15 °C, 40 % a 25 °C e 70 % a 35 °C foram completamente abolidas após a aplicação de rianodina. Já RIVAROLI (2002), estudando o tecido ventricular do curimatá, *Prochilodus lineatus*, e do cascudo, *Hypostomus regani*, ambos a 25 °C, obteve potenciações pós-pausa de 60 % e 20 %, respectivamente, que também foram abolidas pela rianodina.

Considerando que a mitocôndria não tenha importância fundamental na suplementação de  $\text{Ca}^{2+}$  ao aparato contrátil, e que as características de ligação da rianodina sejam similares em mamíferos e em peixes, podemos sugerir que o  $\text{Ca}^{2+}$  responsável pela ativação das miofibrilas causando a contração muscular no tecido ventricular de *S. marmoratus*, deve originar-se de pelo menos duas fontes: o meio extracelular e o RS, assim como também observado em pacu, curimatá, cascudo e traíra.

Alguns autores sugerem haver uma correlação entre a existência de um RS funcional no tecido cardíaco e um alto nível de atividade por parte da espécie. Este foi o caso para os atuns e a cavala, espécies de natação rápida, descritas como espécies “atléticas”, pertencentes à família Scombridae (KEEN et al., 1992; AHO & VORNANEN, 1998; SHIELS et al., 1999; SHIELS E FARRELL, 2000). Há também a sugestão de que elevações da temperatura aumentem a atividade do RS e, conseqüentemente, seu grau de participação como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  ao aparato contrátil, o que se constituiria em uma estratégia adaptativa a elevações bruscas da temperatura (SHIELS & FARRELL, 1997).

Os resultados obtidos no presente estudo contrariam a hipótese de correlação entre funcionalidade do RS e nível de atividade uma vez que o muçum é uma espécie de hábitos sedentários e apresentou evidências de um RS bastante funcional. Da mesma forma, a traíra e o cascudo também são espécies sedentárias com RS funcional.

A correlação entre elevação da temperatura e aumento de atividade do RS também não se aplicou ao presente estudo uma vez que a maior participação de RS do tecido ventricular de muçum foi verificada a 25 °C, ou seja, na temperatura de aclimatação. Corroborando tais resultados, a traíra apresentou RS funcional independente da temperatura testada (15, 25 ou 35 °C – OLLE, 2003). Além disso, o amorê e a tilápia do Nilo, espécies comumente sujeitas a elevações agudas e diárias na temperatura, não apresentaram

sensibilidade à rianodina, como dito anteriormente (RANTIN, et al., 1998, COSTA et al., 2000).

Uma hipótese para explicar a presença de RS funcional, sugerida por RIVAROLI (2002), é a posição sistemática em que se encontram essas espécies. Revisando a filogenia das espécies estudadas, este autor constatou que todas as espécies neotropicais que apresentam RS funcional pertencem a superordem OSTAROIPHYSI. Reforçando esta hipótese, temos que as espécies de peixes nas quais não constatou-se a presença de um RS funcional (insensíveis à rianodina) pertencem às superordens ACANTHOPTERYGII, PARACANTHOPTERYGII e PROTOACANTHOPTERYGII. Porém, existem algumas exceções como, por exemplo, alguns exemplares da família SCOMBRIDAE, como atuns *Katsuwonus pelamis* (KEEN et al., 1992) e *Thunnus albacares* (SHIELS et al., 1999) e a cavala *Scomber japonicus* (SHIELS & FARRELL, 2000) que apresentam RS funcional mesmo sendo pertencentes à superordem ACANTHOPTERYGII. Neste caso, esta pode ter sido uma adaptação desenvolvida pela família Scombridae para manter a performance cardíaca durante a natação rápida. Da mesma forma, o muçum também pertence à superordem ACANTHOPTERYGII, o que sugere um conservacionismo filogenético dessa estrutura.

Porém, mais estudos envolvendo um número maior de espécies, de famílias e superordens são necessários para se comprovar a hipótese filogenética da funcionalidade do RS.

Os resultados obtidos são indicativos que a espécie estudada possui um RS funcional, oferecendo importante contribuição para o manejo do  $Ca^{2+}$  no seu músculo cardíaco em termos de acumulação e liberação deste íon. Corroborando tais resultados, HOCHACHKA & HULBERT (1978) descreveram uma extensa elaboração do RS interfibrilar no miocárdico ventricular de *S. marmoratus*, uma característica impressionante, segundo esses autores, que separa a ultraestrutura do coração de muçum das encontradas para as demais espécies de teleósteos já estudados, nas quais essa organela é geralmente menos desenvolvida anatomicamente e menos importante para acoplamento E-C (BAILEY & DRIEDZIC, 1990; FARREL & JONES, 1992).

#### 5.2.4. Efeitos de Incrementos da Frequência de Estimulação

Dentre os vários grupos de vertebrados, existem grandes diferenças no que se refere à relação entre a força de contração e a frequência de estimulação imposta ao músculo cardíaco. Os motivos que levam a estas diferenças parecem ter relação com as variações nos processos que envolvem a utilização do RS como organela fundamental para a acumulação e liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para o acoplamento E-C (HAJDU, 1969).

Embora a análise da tensão pós-pausa seja a maneira tradicional de se verificar a importância funcional do RS na regulação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  em músculo isolado, é importante verificar a participação do RS em frequências e temperaturas fisiologicamente relevantes, por meio de do estudo da relação entre a força de contração e a frequência de estimulação das tiras musculares isoladas na ausência e presença de rianodina.

A relação entre a força isométrica máxima e a frequência de contração, ou relação força frequência, ou ainda chamada de efeito de Bowditch, é documentada para diversas espécies de peixes (SHIELS et al., 2002). Para a maioria das espécies estudadas, essa relação mostra a perda ou diminuição da Fc quando a frequência de estimulação das tiras cardíacas isoladas é aumentada. Esta relação inversa é conhecida como relação força-frequência negativa ou efeito escada negativo. Em tiras atriais e ventriculares da maioria dos teleósteos estudados, um aumento na frequência de estimulação causa uma redução da tensão isométrica máxima, ou Fc, redução no estado ativo e na taxa de contração (ASK, 1983; DRIEDZIC & GESSER, 1985; VORNANEN, 1989; SHIELS et al., 2002). Assim, em frequências elevadas a força é reduzida de 50 a 90% no músculo cardíaco da maioria dos teleósteos antes que as mesmas se tornem arrítmicas (FARRELL & SHIELS, 2000; SHIELS et al., 2002).

A análise da Fc e dos processos tempo-dependentes das tiras ventriculares de *S. marmoratus* após incrementos na frequência de estimulação foi obtida com o objetivo de verificar uma possível limitação dos mecanismos envolvidos com o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o ciclo cardíaco.

O pico de tensão indica a real capacidade inotrópica do coração (SHIELS & FARRELL, 1997). O presente estudo demonstrou que os diferentes tratamentos impostos (diferentes temperaturas, concentrações de adrenalina e aplicação de rianodina) afetaram o pico máximo de tensão com o grau de efeito variando com as diferentes freqüências de estimulação. Além da Fc, houve mudanças na duração de ambas as variáveis tempo-dependentes (TPT e THR) com mudanças na temperatura testada e na freqüência de estimulação. Tanto o TPT quanto o THR, em todas as temperaturas testadas, sofrem reduções significativas com o aumento da freqüência, refletindo tanto em um menor tempo para o aporte dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  às miofibrilas contráteis quanto para a retomada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS e/ou meio extracelular.

Uma relação força-freqüência positiva, ou seja, aumento da Fc durante incrementos na freqüência de estimulação, foi observada em alguns grupos de vertebrados quando expostos à baixa freqüência de estimulação, como é o caso de tiras ventriculares de mamíferos, répteis, anfíbios e elasmobrânquios (DRIEDZIC & GESSER, 1985, 1988) e no tecido atrial de atuns, *K. pelamis* (KEEN et al., 1992). Porém esta relação torna-se negativa em freqüências elevadas.

Devido às mudanças no desenvolvimento de Fc estarem diretamente relacionadas a mudanças na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, a relação força-freqüência negativa poderia ser atribuída ao declínio freqüência-dependente da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , evidenciando uma menor capacidade de obtenção de  $\text{Ca}^{2+}$  livre a partir de reservas intracelulares nestes animais. Tal redução na capacidade de obtenção de  $\text{Ca}^{2+}$  livre pode estar associada a mecanismos sarcolemais de transporte destes íons insuficiente do ponto de vista funcional para a manutenção do inotropismo cardíaco a elevadas taxas de estimulação, determinando diretamente o grau de eficiência do acoplamento E-C na musculatura cardíaca (DRIEDZIC & GESSER, 1985). Se isto é verdadeiro, então pode-se sugerir que quando a freqüência atinge sua taxa máxima, a oferta de  $\text{Ca}^{2+}$  para os miofilamentos é reduzida a menos da metade no coração dos peixes (BOYETT, 1992).

Outras limitações importantes para a manutenção da Fc quando a freqüência é aumentada são a distância de difusão intracelular que o  $\text{Ca}^{2+}$  deve atravessar para ativar os miofilamentos, bem como a velocidade na qual este íon deve ser removido do sarcoplasma a fim de promover um relaxamento máximo (KEEN et al., 1992). Para tais processos, a

presença de um RS funcional seria de alta relevância, já que esta organela não funciona apenas como fonte de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para contração, mas também desempenha papel fundamental como armazenador deste íon no relaxamento cardíaco, pela tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de ATP ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS).

Há uma certa relação entre o grau de desenvolvimento do RS e a frequência de contração máxima que um músculo pode atingir, sendo que maiores frequências são observadas em fibras musculares que apresentam um maior grau de desenvolvimento do RS, ou mecanismos de transporte sarcolemais de  $\text{Ca}^{2+}$  muito eficientes (HELLE, 1983).

A diminuição frequência-dependente da Fc, a qual temos como um padrão para a maioria dos teleósteos (SHIELS et al., 2002), foi observada nas tiras ventriculares de *S. marmoratus* nas temperaturas de 25 e 35 °C. Ainda de acordo com esses autores, o decréscimo dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular conforme a frequência de estimulação é aumentada pode ser resultante tanto de uma diminuição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  transarcolemal, via canais voltagem-dependentes do tipo L e/ou trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , como também da menor liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS a elevadas frequências.

De acordo com SHIELS et al. (2002), quando um músculo é forçado a se contrair em frequências elevadas e temperaturas baixas, tanto a Fc como a frequência máxima de contração alcançada pelo músculo diminui, pois o aumento do TPT que seria observado *in vivo*, não ocorre. Ao contrário, o maior decréscimo do TPT quanto menor a temperatura é possivelmente o fator responsável pelas menores frequências de estimulação alcançadas em baixas temperaturas. Esse maior decréscimo na frequência de contração observado em baixas temperaturas também foi registrado para *S. marmoratus* a 15 °C.

Além disso, os resultados obtidos revelam que a frequência de estimulação máxima suportada pelas tiras ventriculares de *S. marmoratus* é maior quanto maior for a temperatura, resultado este corroborado por outros estudos realizados com várias espécies de peixes neotropicais. Este foi o caso para os estudos realizados por RANTIN et al. (1998), com o âmborê, *B. soporator*, COSTA et al. (2000), com a tilápia do Nilo, *O. niloticus*, ANELLI JR et al. (2004), com o pacu, *P. mesopotamicus*, e COSTA et al. (2004), com a pirambóia, *L. paradoxo*, Além disso, esse padrão de resposta também foi documentado para espécies de ambientes temperados por SHIELS et al. (2002), com truta



açó-íris, *O. mykiss* e carpa, *Carassius carassius* e SHIELS & FARRELL (2000), com cavala do Pacífico, *S. japonicus*.

Assim como o observado em cavala do Pacífico (SHIELS & FARRELL, 2000), o aumento da temperatura diminuiu a Fc em tiras ventriculares de *S. marmoratus*. O mesmo efeito pode ser visto quando a temperatura era diminuída. Em alguns teleósteos, foi evidenciado que há uma faixa estreita de temperatura onde a Fc do músculo isolado não é alterada, podendo este manter a mesma Fc desenvolvida em temperaturas próximas a temperatura de aclimação. Porém, em muçum, o grau de utilização do RS, baseado em experimentos de força-freqüência com e sem rianodina, é semelhante na temperatura de aclimação e na temperatura mais elevada, fato este também observado por SHIELS & FARRELL, (2000).

O pico máximo de tensão muda inversamente com mudanças agudas de temperatura em *Lota lota* (de 1 para 18 °C - TIITU & VORNANEN, 2002), *Carassius carassius* (de 20 para 1°C - VORNANEN, 1989), *Thunnus albacares* (15, 18 e 25 °C - SHIELS et al., 1999) e *Scomber japonicus* (15, 20 e 25 °C - SHIELS & FARRELL, 2000). A mesma tendência foi registrada para ventrículos de *B. saporator* (de 25 para 40°C - RANTIN et al., 1998) e *O. niloticus* (de 25 para 40°C - COSTA et al., 2000). Esse padrão também foi obtido no presente estudo, onde a elevação da temperatura de 25 para 35 °C causou diminuição no desenvolvimento de tensão na ordem de 30 %. Os resultados obtidos diferem dos observados tanto para o teleósteo neotropical *P. mesopotamicus* (ANELLI JR et al., 2004) quanto para o de ambientes temperados *O. mykiss* (SHIELS & FARRELL, 1997), onde aumentos de 10°C na temperatura experimental não afetaram a geração de força nessas espécies.

As alterações causadas pela elevação na temperatura também foram vistas na cinética de contração das tiras ventriculares de *S. marmoratus*, onde o aumento da temperatura diminui tanto o TPT como o THR em condições controle. Respostas similares foram observadas para a diminuição aguda da temperatura, onde também houve queda na Fc e conseqüente aumento dos parâmetros tempo-dependentes.

A diminuição da Fc com o aumento da temperatura registrado *in vitro* junto com o significativo aumento na freqüência cardíaca *in vivo* fornecem subsídios para se avaliar a

importância dos ajustes cronotrópicos da espécie para manutenção da função cardíaca durante mudanças agudas da temperatura.

As frequências máximas observadas *in vitro* para tiras ventriculares de *S. marmoratus* superam a frequência cardíaca *in vivo*. Tal resultado é consistente com os obtidos para varias espécies, tanto de clima tropical como temperado, indicando que os miócitos cardíacos não estão trabalhando, *in vivo*, no limite de capacidade de seu acoplamento E-C. Isto sugere a atuação de mecanismos intrínsecos ao tecido miocárdico na modulação da frequência cardíaca e/ou ocorrência de limitações fisiológicas no músculo isolado não relacionados a regulação de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Existem evidências de que a capacidade do RS em acumular e liberar  $\text{Ca}^{2+}$  a cada batimento é maior em frequências de estimulação maiores (SHIELS et al., 2002). Assumindo um padrão típico para os teleósteos neotropicais já estudados (COSTA et al., 2004; OLLE, 2003), no miocárdio ventricular de *S. marmoratus* a utilização o RS será menor quanto maior for a frequência de estimulação. Tal padrão de resposta ocorreu tanto a 25 quanto a 35 °C, onde a porcentagem de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular utilizado pela maquinaria contrátil se torna menor quanto maior for a frequência de estimulação, visto que não houve diferença na Fc desenvolvida por preparações com e sem rianodina em frequência elevadas.

Segundo HOVE-MADSEN (1992) e SHIELS & FARRELL (2000), a temperatura tem a capacidade de modular a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  que passa pelo RS, aumentando a atividade de bombas iônicas e fazendo com que esta organela passe a ter uma maior participação no manejo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  conforme a temperatura é aumentada, como discutido anteriormente. Por outro lado, sem a participação direta do RS no manejo de  $\text{Ca}^{2+}$ , as tiras ventriculares de *S. marmoratus* apresentaram um decréscimo na Fc, tanto a 25 quanto à 35 °C, na faixa de frequências observadas *in vivo* para estas temperaturas (aproximadamente 0,5 e 0,9 Hz, respectivamente), indicando que o RS é potencialmente funcional e contribui significativamente para manutenção da tensão isométrica nessas temperaturas, exercendo um papel importante no manejo do  $\text{Ca}^{2+}$  quando consideradas as frequências observadas *in vivo*. As reduções de 37,8 % a 25 °C e 33,5 % a 35 °C (0,5 e 0,9 Hz, respectivamente) na Fc após a aplicação de rianodina corroboram tal afirmação. Além disso, observou-se uma redução progressiva no papel do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para a manutenção da Fc com o aumento da frequência, uma vez que os resultados obtidos para as

preparações controle e na presença de rianodina se aproximaram à medida que frequências superiores às verificadas *in vivo* foram impostas.

O miocárdio ventricular de *S. marmoratus* mantém-se sensível à rianodina mesmo após aumento na temperatura, diferentemente do observado em truta (HOVE-MADSEN, 1992). Quando consideradas as frequências cardíacas obtidas *in vivo*, tanto em 25 como 35 °C, o inotropismo negativo provocado pela rianodina foi superior ao efeito deste alcalóide descrito para espécies de peixes que comprovadamente apresentam um RS funcional em frequências fisiológicas, como a cavala de Pacífico, *Scomber japonicus* (redução de 20%; SHIELS & FARRELL, 2000), truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (redução da Fc em 15 %; HARWOOD et al., 2000), pirambóia, *Lepdosiren paradoxa* (redução de 25 %; COSTA et al., 2004), atum, *Katsuwonus pelamis* (redução de 30%; KEEN et al., 1992). Porém, a contribuição do RS para a geração de força de contração ventricular apresentada pelo *S. marmoratus* se compara a certas espécies de peixes, como para miócito atrial do atum *Thunnus albacares*, no qual a rianodina provocou uma redução da Fc de 60 % nas frequências observadas *in vivo* (SHIELS et al., 1999), e para traíra *Hoplias malabaricus*, apresentando 50 % de redução na Fc em tiras ventriculares (OLLE, 2003).

Assim como em atuns (SHIELS et al., 1999), *S. marmoratus* não apresentou sensibilidade à rianodina em todas as frequências testadas, mostrando redução na força após adição de rianodina nas frequências iniciais e intermediárias. Diferentemente disto, alguns scombrídeos (SHIELS & FARRELL, 2000) parecem ter como características a redução da Fc pela rianodina em todas as frequências de estimulação testadas.

No presente estudo, a aplicação de rianodina na temperatura de aclimação diminuiu o pico de tensão em aproximadamente 43 % a 0,2 Hz, apresentando diferença significativa até 0,8 Hz (redução de 32 %). Apesar do efeito inotrópico negativo da elevação da temperatura (a força registrada a 35 °C foi sempre inferior à registrada a 25 °C), a 35 °C a contribuição do RS se assemelha à temperatura de aclimação pois a rianodina diminuiu a Fc em aproximadamente 43,5 %. Isto reforça importância do RS como organela fornecedora de Ca<sup>2+</sup> para contração, embora uma significativa parcela desse íon provenha dos espaços extracelulares. Resultado diferente foi descrito por SHIELS & FARRELL (1997) para o tecido ventricular de truta arco-íris, *O. mykiss*, onde a natureza temperatura-dependente dos canais de Ca<sup>2+</sup> do RS foi demonstrada. Estes autores verificaram que nos

exemplares aclimatados e testados a 12 °C, a rianodina reduziu a Fc em aproximadamente 25% a 0.2 Hz, mas não teve efeito significativo 1.2 Hz. Já nos exemplares aclimatados e testados a 22 °C, a rianodina causou 50% de redução na Fc a 0,2Hz, 25% a 1.2 Hz e de 20% a 2.0 Hz.

A insensibilidade à rianodina verificada a 15 °C no presente estudo está de acordo com os resultados descritos por SITSAPESAN et al. (1991), BERS (1989), TIBBITS et al. (1991) e KEEN et al. (1992), que mostram que no RS, o estado aberto dos canais de rianodina é mantido por um período muito maior quando testados em baixas temperaturas do que quando testados na temperatura de aclimação. Se esta for uma propriedade geral do tecido cardíaco de todos os vertebrados, então, a menor temperatura pode promover o estado aberto dos canais de rianodina por um período muito maior, reduzindo a efetividade do RS em armazenar  $Ca^{2+}$  durante as contrações, subestimando assim os resultados obtidos após adição de rianodina. Esta informação pode ser importante para explicar a ausência de resposta à rianodina a 15 °C, podendo levar à interpretação incorreta de que nesta temperatura, ocorra uma inativação do armazenamento de  $Ca^{2+}$  no RS desta espécie.

A 35 °C, a relação força-freqüência negativa foi abolida pela adição de rianodina, só havendo redução na Fc na máxima freqüência testada (2,0 Hz), resultado que se assemelha ao encontrado por HOVE-MADSEN (1992), para truta. Este mesmo autor observou que a rianodina também não teve efeitos significantes sobre o TPT e THR.

A redução da Fc das tiras ventriculares de *S. marmoratus* promovida pela rianodina a 25 e 35 °C não foi acompanhada por um decréscimo pronunciado dos parâmetros tempo-dependentes, semelhante ao descrito por outros autores (HOVE-MADSEN, 1992; OLLE, 2003), onde o TPT e o THR não apresentaram sensibilidade à rianodina em nenhuma das temperaturas ou freqüências utilizadas. Esses resultados indicam que, nessas temperaturas, a ausência de participação do RS como fornecedor e seqüestrador de íons  $Ca^{2+}$  não afetou a velocidade, mas sim a quantidade de íons  $Ca^{2+}$  disponíveis no citosol dos cardiomiócitos desta espécie. Outros mecanismos envolvidos com o fornecimento e extrusão de  $Ca^{2+}$  do citosol, como trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ , canais de  $Ca^{2+}$  e bomba de  $Ca^{2+}$ ATPase da sarcolema, podem estar sendo suficientemente eficientes em remanejar a entrada e saída deste íon dentro da célula, já que a quantidade de  $Ca^{2+}$  é comprovadamente menor, o que foi evidenciado pelo inotropismo negativo causado pela rianodina.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que pelo menos dois mecanismos estão envolvidos na regulação da produção de força no coração de *S. marmoratus*. Primeiro, um componente afetado pela frequência de estimulação, dependente do fluxo iônico através da sarcolema, e outro dependente do RS e sensível à rianodina, a qual reduz significativamente a Fc.

O coração dos teleósteos apresenta inervação adrenérgica e está sob a ação adrenérgica das catecolaminas circulantes produzidas pelo tecido cromafim (LAURENT et al., 1983). As células cromafins podem ser definidas como quaisquer células derivadas da neuroectoderme, invadidas por fibras pré-ganglionares simpáticas e capazes de sintetizar, secretar e armazenar catecolaminas, sendo que em mamíferos elas estão presentes principalmente na medula da adrenal, enquanto em peixes carecem de glândulas adrenais verdadeiras, apenas sendo evidenciados agregados de células cromafim em diferentes órgãos, dependendo da espécie (SCHEUERMANN, 1993).

A influencia da adrenalina sobre a contratilidade miocárdica se dá por diversos mecanismos. O efeito inotrópico positivo observado após estimulação adrenérgica esta normalmente associado ao aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  transsarcolemal mediado pela transdução de sinal via estimulação  $\beta$ -adrenérgica, como visto em mamíferos (CARMELIET & VEREECKE, 1969) e em diversos teleósteos (SHIELS & FARRELL, 1997; RANTIN et al., 1998). Porém, não se pode excluir o efeito inotrópico positivo que também é desempenhado via estimulação de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (SHIELS & FARRELL, 1997). A estimulação de  $\alpha$ -adrenoreceptores em mamíferos aumenta a sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$  e pode aumentar a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular pela da ativação de 1,4,5-trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) (BENFEY, 1990). O  $IP_3$  induz a liberação de  $Ca^{2+}$  do RS em células de músculo liso, mas também parece causar liberação de  $Ca^{2+}$  do RS em tecido muscular cardíaco, apesar da taxa de indução da liberação de  $Ca^{2+}$  ser menor que a liberação de cálcio cálcio-induzida (KENTISH et al., 1990). O papel do  $IP_3$  no miocárdio de peixes é ainda pouco conhecido.

Embora os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos possam estar presentes na membrana sarcolemal de várias espécies de peixes, estes não são responsáveis pelo efeito inotrópico ou cronotrópico das catecolaminas verificados em espécies como truta arco-íris (ASK, 1983; FARRELL et al., 1996), linguado (*Pleuronectes platessa*) (ASK, 1983) e carpa

(*Carassius carassius*) (VORNANEN, 1989), mas podem mediar tais efeitos na enguia americana (*Anguilla anguilla*) (PEYRAUD-WAITZENEGGER et al., 1980) e perca (*Perca fluviatilis*) (TIRRI & LEHTO, 1984).

Adicionalmente, de acordo com FARREL & JONES (1992), a resposta cardíaca à estimulação adrenérgica em peixes é dependente, em grande escala, da densidade dos subtipos de receptores adrenérgicos ( $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenorreceptores), da sensibilidade do adrenorreceptor e da concentração e tipo de agonista (adrenalina ou noradrenalina). Esses autores descrevem que em muitos teleósteos, com exceção da carpa (*Cyprinus carpio*), a adrenalina é a catecolamina predominante na circulação, embora tanto a adrenalina como a noradrenalina podem se co-relacionar para produzir os efeitos adrenérgicos em terminações nervosas no coração de peixes.

Alguns estudos demonstraram a presença de um nível tônico de adrenalina ( $5 \times 10^{-9}$  M) na circulação de peixes em repouso (MILLIGAN et al., 1989), com suas concentrações aumentando para  $5 \times 10^{-6}$  M sob condições de estresse elevado (McDONALD & MILLIGAN, 1992). Essa elevada concentração de adrenalina circulante aumentaria a disponibilidade de  $Ca^{2+}$  ao aparato contrátil aumentando o gradiente transsarcolemal de  $Ca^{2+}$ , por meio da exacerbação dos mecanismos de transportes iônicos através da sarcolema, o que minimizaria o efeito inotrópico negativo resultante do aumento da frequência cardíaca (redução na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  à medida que a frequência contrátil é aumentada) (KEEN et al., 1992; SHIELS & FARRELL, 1997; SHIELS et al., 1999; SHIELS & FARRELL, 2000; SHIELS et al., 2002). Para se testar essa possibilidade, a relação força-frequência foi estudada, nas 3 temperaturas experimentais, na presença de uma concentração tônica de adrenalina (grupo BA -  $10^{-8}$  M), que posteriormente foi acrescida de  $10 \mu\text{M}$  de rianodina (grupo BA+RIAN) e, finalmente, a quantidade de adrenalina corrigida para uma concentração máxima ( $10^{-5}$  M – grupo AA+RIAN).

A concentração tônica de adrenalina (BA), além de não interferir com a geração de Fc em nenhuma temperatura testada, também não provocou profundas alterações nos parâmetros tempo-dependentes. A  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , o TPT e o THR do grupo BA não apresentaram nenhuma alteração significativa em relação ao grupo controle, enquanto que a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , reduções desses parâmetros foram verificadas apenas na menor frequência de estimulação.

Devido ao fato de, no presente estudo, não terem sido detectadas diferenças significativas entre os valores de Fc, TPT e THR obtidos para as preparações controle e para as que receberam a concentração tônica de adrenalina (BA), o grupo BA passou a ser o controle para as demais preparações, procedimento já utilizado por outros autores (SHIELS et al., 1999; SHIELS & FARRELL, 2000; SHIELS et al., 2002).

A estimulação adrenérgica máxima após adição de rianodina aumentou o TPT e o THR tanto na temperatura de aclimatação quanto em 35 °C. Pesquisas com músculo cardíaco de mamíferos demonstraram que a estimulação adrenérgica causa um rápido relaxamento, causado principalmente pela exacerbação da atividade da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da sarcolema e por uma maior atividade da bomba de  $\text{Na}^+$ , levando a um aumentado efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da sarcolema via trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (BERS, 1991). Porém, a elevação do THR após estimulação adrenérgica máxima no presente estudo sugere um efeito adrenérgico diferente sobre a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  como visto em mamíferos. Visto que a aplicação de rianodina não alterou os parâmetros tempo-dependentes, parece que a atividade do RS não é fundamental para o relaxamento ou para o tempo máximo para o pico de tensão nesta espécie.

Como a estimulação adrenérgica máxima aumenta consideravelmente a Fc exercida pelo ventrículo desta espécie, pode-se sugerir que a maciça entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  através da sarcolema, que é a responsável pelo efeito inotrópico positivo após estimulação adrenérgica, não é eficientemente retirada do citosol durante o relaxamento. Sendo assim, é de se esperar que o THR se eleve. O mesmo efeito foi descrito para truta arco-íris (SHIELS & FARRELL, 1997), sendo que os autores não encontraram explicações totalmente claras para o ocorrido. Isto mostra que mesmo exibindo acentuado aumento na Fc, aumentando consideravelmente a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  disponível para acoplamento E-C, os miócitos desta espécie não possuem eficientes mecanismos de transporte destes íons através de suas membranas, quer seja pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da sarcolema ou pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , quando a estimulação adrenérgica é alta.

Sendo que a adrenalina causa fosforilação dos canais L da sarcolema, permitindo que seu estado aberto seja prolongado, é de se esperar que o TPT também seja elevado, promovendo um tempo maior de entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  elevando também a Fc e exigindo um tempo maior para o relaxamento.

A estimulação adrenérgica máxima combinada com o bloqueio da função do RS (AA+RIAN) aumenta a Fc, que atinge os valores encontrados em presença de adrenalina tônica sem presença de rianodina (BA). Pode-se concluir, então, que a estimulação adrenérgica máxima é capaz de compensar a ausência de funcionalidade do RS como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$ , podendo o influxo deste íon através da sarcolema sustentar os níveis de Fc. Isto mostra que o ventrículo de *S. marmoratus* pode facilmente aumentar a habilidade de geração de Fc pelo aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via sarcolema, suprimindo a necessidade de uma contribuição do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, quanto está sob estímulo adrenérgico elevado. O aumento de Fc mediado pela alta concentração de adrenalina, após adição de rianodina, também ocorreu em espécies de ambientes temperados como truta arco-íris (SHIELS & FARRELL, 1997) e cavala do Pacífico (SHIELS & FARRELL, 2000). Porém, embora aumentos no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via sarcolema em altas concentrações de adrenalina compensem a menor liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS em uma faixa de frequências de estimulação (0,6 Hz a 25 °C e 1,2 até Hz a 35 °C), esta compensação é inadequada e insuficiente em frequências mais elevadas.

Um aspecto do acoplamento E-C cardíaco de *S. marmoratus* que se assemelha ao de outras espécies de ambientes temperados, como por exemplo a cavala do Pacífico (SHIELS & FARRELL, 2000) e a truta arco-íris (SHIELS & FARRELL, 1997), é a capacidade da estimulação adrenérgica máxima reverter a resposta inotrópica provocada pela rianodina, restabelecendo a Fc para níveis semelhantes aos registrados com estimulação adrenérgica mínima sem a presença de rianodina.

Além de agir na membrana plasmática dos cardiomiócitos, a estimulação adrenérgica aumenta o  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico aumentando o acúmulo deste íon no interior do RS pela fosforilação do fosfolambano, uma proteína integrante da membrana do RS (BERS, 2002; SHIELS et al., 2002). Pelo fato da adrenalina ser capaz de compensar o efeito inotrópico negativo da rianodina no presente estudo, pode-se sugerir que a via para o efeito inotrópico positivo causado pela adrenalina seja distinta do RS e localizada preferencialmente na sarcolema, quer seja pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ou pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .

De qualquer forma, independentemente da temperatura experimental, uma contratilidade cardíaca adequada (i.e., ausência de relação força-frequência negativa) é



---

observada nas preparações controle nas frequências observadas *in vivo*. Isto indica que, a despeito da fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  a ser utilizada pelas miofibrilas, o coração da espécie parece ser capaz de manter seu inotropismo inalterado ou até aumentá-lo quando as frequências *in vivo*, ou mesmo superiores, são atingidas. Tal fator deve promover um aumento substancial do débito cardíaco como resultado de aumentos concomitantes do volume sistólico (via inotropismo positivo) e da frequência cardíaca.

## 6. CONCLUSÕES

As informações obtidas relacionadas às respostas cardíacas *in vivo* e *in vitro* de *S. marmoratus*, aqui apresentadas e discutidas, permitem as seguintes conclusões:

- a. O aumento significativo da  $f_H$  *in vivo* durante a transição aguda da temperatura de 25 para 35 °C e a diminuição significativa da mesma durante a transição de 25 para 15 °C demonstram a grande importância dos ajustes cronotrópicos em resposta a alteração térmica;
- b. Não houve deterioração da força de contração das tiras ventriculares de *S. marmoratus* eletricamente estimuladas por um período de 40 minutos, sendo estas hábeis em manter a Fc constante durante esse tempo nas temperaturas de 15, 25 e 35°C.
- c. Em *S. marmoratus*, a elevação da concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular resultou em uma resposta inotrópica positiva somente na temperatura máxima testada (35 °C), o que reflete a dependência da performance cardíaca ao  $Ca^{2+}$  extracelular nesta temperatura;
- d. A 35 °C, houve aumento do THR após incrementos na concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular, refletindo o comprometimento dos mecanismos envolvidos na extrusão deste íons em altas concentrações;
- e. A capacidade do miocárdio ventricular de manter a elevação da Fc em resposta a uma ampla faixa de incrementos da concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular indica a presença de poderosos mecanismos de tamponamento intracelular nos miócitos cardíacos desta espécie;
- f. A elevação da frequência de estimulação causou um efeito escada negativo nas temperaturas de 25 e 35 °C, sendo que tais reduções na Fc foram mais acentuadas a 35 °C. Além disso, a frequência de estimulação máxima suportada pela espécie é maior quanto mais elevada for a temperatura;
- g. Nessa espécie, o retículo sarcoplasmático (RS) participa significativamente no manejo do  $Ca^{2+}$  durante o acoplamento E-C cardíaco nas temperaturas de 25 e 35

- °C, uma vez que o tratamento com rianodina resultou em uma diminuição significativa da Fc nessas temperaturas;
- h. Altas concentrações de adrenalina foram capazes de reverter o efeito inotrópico negativo causado pela rianodina, mostrando que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema pode compensar a redução da Fc causado pela inativação funcional do RS;
  - i. Em *S. marmoratus*, o  $\text{Ca}^{2+}$  responsável pela ativação dos miofilamentos deve derivar de pelo menos duas fontes: uma proveniente dos espaços extracelulares (evidenciado pelo aumento de Fc durante incrementos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular) e uma fração significativa fornecida por fontes internas, ou seja, o RS.
  - j. Assim como a Fc, as variações na temperatura resultaram em alterações dos parâmetros tempo-dependentes, indicando que os mecanismos de transporte de íons  $\text{Ca}^{2+}$  responsáveis pela contração e relaxamento cardíacos são bastante dependentes da temperatura;
  - k. Os miócitos parecem não estar trabalhando, *in vivo*, no limite da capacidade do acoplamento E-C, visto que as frequências máximas observadas *in vitro* superam aquelas observadas *in vivo*, em todas as temperaturas testadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHO, E. & VORNANEN, M.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by sarcoplasmic reticulum in fish heart: effect of thermal acclimation. *J. Exp. Biol.*, v. 201, pp. 232-252, 1998.
- ANELLI Jr., L.C., OLLE, C.D., COSTA, M.J., RANTIN, F.T. & KALININ, A.L. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from the neotropical teleost *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887-Teleostei, Serrasalminidae). *J. Therm. Biol.*, 29, 103-113, 2004.
- ASK, J.A. Comparative aspects of adrenergic receptors in the hearts of lower vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 76, n. 3, pp. 543-552, 1983.
- BAILEY, J.R. & DRIEDZIC, W.R. Enhanced maximum frequency and force development of fish hearts following temperature acclimation. *J. Exp. Biol.*, v. 149, pp. 239-254, 1990.
- BAILEY, J.R.; RODNICK, K.J.; MacDOUGALL, R.; CLOWE, S. & DRIEDZIC, W.R. Anoxic performance of the American eel (*Anguilla rostrata*) heart requires extracellular glucose. *J. Exp. Zool.*, v. 286, pp. 699-706, 2000.
- BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A. & BERS, D.M. A method to estimate mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in intact cardiac myocytes. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 29, pp. 1699-1707, 1996.
- BENFEY, B.G. Function of myocardial  $\alpha$ -adrenoreceptors. *Life Sci.*, v. 46, pp. 743-757, 1990.
- BERS, D.M. Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during postrest recovery. *Am. J. Physiol.*, v. 248, pp. H366-H381, 1985.
- BERS, D.M. SR  $\text{Ca}^{2+}$  loading in cardiac muscle preparations based on rapid cooling contractures. *Am. J. Physiol.*, v. 256, pp. C109-C120, 1989.
- BERS, D.M. Ca regulation in cardiac muscle. *Med. Sci Sports Exerc.*, v. 23, n. 10, pp. 1157-1162, 1991.
- BERS, D.M. Excitation – Contraction coupling and cardiac contractile force. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers (2° Ed.), pp. 426, 2001.

- BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, v. 415, pp. 198-204, 2002
- BOSSEN, E.H. & SOMMER, J.R. Comparative stereology of the lizard and frog myocardium. *Tissu & Cell.*, v. 16, pp. 173-178, 1984.
- BOWLER, K & TIRRI, R. Temperature dependence of the heart isolated from the cold or warm acclimated pech (*Perca fluviatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 96A, n. 1, pp. 177-180, 1990.
- BOYETT, M.R. The role of intracellular calcium, sodium, and pH in the rate dependent changes of cardiac contractile force. In: Noble, M.I.; Seed, W.A. The interval-force relationship of the heart: Bowditch revisited. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 111-172, 1992.
- CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.*, v.56, pp. 395-433, 1987.
- CARAFOLI, E. The signaling function of calcium and its regulation. *J. Hypertension*. v. 12, pp. 547-556, 1994.
- CARMELIET, E. & VEREECKE, J. Adrenaline and the plateau phase of the cardiac action potencial. *Pflugers Arch. (Eur. J. Physiol.)*, v. 313, pp. 300-315, 1969.
- CHAPMAN, R.A. Control of cardiac contractility at the cellular level. *Am. J. Physiol.*, v. 245, n. 14, pp. H535-H552, 1983.
- COOPER, R., KRUM, H., TZINAS, G., SYLVIA, P., BELLE, S. & KAUFMAN, L. A preliminary study of clinical techniques utilized with blue fin tuna (*Thunnus thynnus* Linnæus); a comparison of some captive and wild caught blood parameters. In: International Association for Aquatic Animal Medicine Proceedings (ed. B. Fenwick), pp. 26-35, 1994.
- CORONADO, R.; MORRISSETTE, J.; SUKHAREVA, M. & VAUGHAN, D.M. Structure and function of ryanodine receptors. *Am. J. Physiol.*, v. 246, n. 35, pp. C1485-C1504, 1994.
- COSTA, M.J.; OLLE, C.D.; KALININ, A.L. & RANTIN, F.T. Role of the sarcoplasmic reticulum in calcium dynamics of the ventricular myocardium of *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi) at different temperatures. *J. Therm. Biol.*, v. 29, pp. 81-89, 2004.

- COSTA, M.J.; OLLE, C.D.; RATTO, J. A.; ANELLI Jr., L.C.; KALININ, A.L. & RANTIN, F.T. Effects of acute temperature transitions on chronotropic and inotropic responses in the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa*. *J. Therm. Biol.*, v. 27, pp. 39-45, 2002.
- COSTA, M.J.; RIVAROLI, L.; RANTIN, F.T. & KALININ, A.L. Cardiac tissue function of the teleost fish *Oreochromis niloticus* under different thermal conditions. *J. Therm. Biol.*, vol. 25, pp. 373-379, 2000.
- COYNE, M.D., KIM, C.S., CAMERON, J.S., & GWATHMEY, J.K. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, v. 278, R1535-R1544, 2000.
- DRIEDZIC W.R. & GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. *Physiol. Rev.*, v. 74, n. 1, pp. 221-258, 1994.
- DRIEDZIC, W.R. & GESSER, H.  $Ca^{2+}$  protection from the negative inotropic effect of contraction frequency on teleosts hearts. *J. Comp. Physiol. B*, v. 156, pp 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, pp. 227-241, 1988.
- EISNER, D.A. the control of  $Ca^{2+}$  release from the cardiac sarcoplasmic reticulum: regulation versus autoregulation. *Cardiovasc. Res.*, v. 38, pp. 589-604, 1998.
- FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.*, v. 245, n. 14, pp. C1-C14, 1983.
- FARREL, A.P. & JONES, D.R. The heart. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrel, A.P. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. 12 (A). The Cardiovascular system. Academic Press, New York, pp. 1-88, 1992.
- FARRELL, A.P. & SHIELS, H.A. Comparative aspects of cardiac contractility in teleost fish: clues about E-C coupling from isometric studies. In: Proceedings of the "International Congress on the Biology of fish: Fish Cardiorespiratory Physiology, Aberdeen, Scotland, pp. 45-51, 2000.

- FARRELL, A.P. From hagfish to tuna: a perspective on cardiac functions in fish. *Physiol. Zool.*, v. 64, pp. 1137-1164, 1991.
- FARRELL, A.P.; GAMPERL, A.K.; HICKIS, J.M.T.; SHIELS, H.A. & JAIN, K.E. Maximum cardiac performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at temperatures approaching their upper lethal limit. *J. Exp. Biol.*, v. 199, pp. 663-672, 1996.
- FRANK, F.K., BOLCK, B. ERDMANN, E., & SCHWINGER, R.G.H. Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovascular Research*. 57, 20-27, 2003.
- GALL, G.A.E. & CRANDELL, P.A. The rainbow trout. *Aquaculture*. V. 100, pp. 1-10, 1992.
- GESSER, H. The effects of hypoxia and reoxygenation on force development in myocardia of carp and rainbow trout: protective effects of  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ . *J. exp. Biol.*, v. 69, pp. 199-206, 1977.
- GESSER, H. Cardiac force-interval relationship, adrenaline and sarcoplasmic reticulum in rainbow trout. *J. Comp. Physiol.B*, v. 166, pp. 278-285, 1996.
- GRAHAM, J.B., LAI, N.C., CHILLER, D. & ROBERTS, J.L. The transition to air breathing in fishes. V. Comparative aspects of cardiorespiratory regulation in *Synbranchus marmoratus* and *Monopterus albus* (Synbranchidae). *J. Exp. Biol.*, v. 198, pp. 1455–1467, 1995.
- HAJDU, S. Mechanism of the Woodworth staircase phenomenon in heart and skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v. 216, n. 1, pp. 206-214, 1969.
- HARPER, A.A.; NEWTON, I.P. & WATT, P.W. The effect of temperature on spontaneous action potential discharge on the isolated sinus venous from winter and summer plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Exp. Biol.*, v. 198, pp. 137-140, 1995.
- HARRISON, S.M. & BERS, D.M. Influence of temperature on the calcium sensitivity of the myofilament of skinned ventricular muscle from the rabbit. *J Gen Physiol.*, v. 91, pp. 411–423, 1989.

- HARRISON, S.M., & BERS, D.M. Temperature dependence of myofilament Ca sensitivity of rat, guinea pig, and frog ventricular muscle. *Am. J. Physiol.*, v. 258, pp. C274–C281, 1990.
- HARWOOD, C.L.; HOWARTH, F.C.; ALTRINGHAM, J.D. & WHITE, E. Rate-dependence changes in cell shortening, intracellular Ca<sup>2+</sup> levels and membrane potential in single, isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ventricular myocytes. *J. Exp. Biol.*, v. 203, pp.493-504, 2000.
- HELLE, K.B. & STORESUND, A. Ultrastructural evidence for a direct connection between the myocardial granules and the sarcoplasmic reticulum in the cardiac ventricle of *Myxine glutinosa* (L.). *Cell tissue Rev.*, v. 163, pp. 353-363, 1975.
- HELLE, K.B. Structures of functional interest in the myocardium of lower vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 76A, n.3, pp. 447-452, 1983.
- HOCHACHKA, P. AND HULBERT, W. Glycogen 'seas', glycogen bodies, and glycogen granules in heart and skeletal muscle of two air-breathing, burrowing fishes. *Can. J. Zool.*, v. 56, pp. 774–786, 1978.
- 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, pp. 61-69, 1989.
- HOVE-MADSEN, L. & TORT, L. L-type Ca<sup>2+</sup> current in the excitation-contraction coupling in single atrial myocytes from rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, v. 275, pp. R2061-R2069, 1998.
- HOVE-MADSEN, L. The influence of temperature on ryanodine sensitivity and the force-frequency relationship in the myocardium of rainbow trout. *J. exp. Biol.*, v. 167, pp. 47-60, 1992.
- HOVE-MADSEN, L.; LLACH, A. & TORT, L. The function of the sarcoplasmic reticulum is not inhibited by low temperatures in trout atrial myocytes. *Am. J. Physiol.*, v. 281, pp. R1902-R1906, 2001.
- JONES, L.R.; BESCH JR, H.R.; SUTKO, J.L. & WILLERSON, J.T. Ryanodine-induced stimulation of net Ca<sup>++</sup> uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 209, pp. 48-55, 1979.



- KEEN, J.E.; FARRELL, A.P.; TIBBITS, G.F. & BRILL, R.W. Cardiac physiology in tunas. II. Effect of ryanodine, calcium, and adrenaline on the force-frequency relationship in atrial strip from skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Can. J. Zool.*, v.70, pp. 1211-1217, 1992.
- KEEN, J.E.; VIANZON, D.M.; FARRELL, A.P. & TIBBITS, G.F. Effect of temperature and temperature acclimation on the ryanodine sensitivity of the trout myocardium. *J. Comp. Physiol.B*, v. 164, pp. 438-443, 1994.
- KENNY, J.S. Views from the bridge: a memoir on the freshwater fishes of Trinidad. St. Joseph, Trinidad and Tobago. v 3, pp. 98, 1995.
- KENTISH, J.; BARSOTTI, R.; LEA, T.; MULLIGAN, T.; PATEL, J. & FERENCZI, M. Calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum induced by photo-release of calcium or Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. *Am. J. Physiol.*, v. 258, pp. H610-H615, 1990.
- KIM, C.S., COYNE, M.D. & GWATHMEY, J.K. Voltage-dependent calcium channel in ventricular cells of rainbow trout: effect of temperature changes in vitro. *Am. J. Physiol Reg. Integrative Comp. Physiol.*, v. 4, pp. R1524-R1534, 2000.
- LAURENT, P.; HOLMGREN, S. & NILSSON, S. Nervous and humoral control of the fish heart: structure and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 76A, n. 3. pp. 525-542, 1983.
- LEKNES, I.L. morphometric analysis of myocardial cells in a teleost. *Anat Anz.*, v. 155, pp. 169-172, 1984.
- MARENCO, F.D.; WANG, S-Y & LANGER, G.A. The effects of temperature upon calcium exchange in intact cultured cardiac myocytes. *Cell Calcium*. v. 21, n. 4, pp. 263-273, 1997.
- MATIKAINEN, N. & VORNANEN, M. Effects of season and temperature acclimation on the function of crucian carp (*Carassius carassius*) heart. *J. Exp. Biol.*, v. 167, pp. 203-220, 1992.
- MATTHEWS, K.R., & BERG, N.H. Rainbow trout responses to water temperature and dissolved oxygen stress in two southern California streampools. *J. Fish Biol.*, v. 50, pp. 50-67, 1997.

- McDONALD, D.M. & MILLIGAN, C.L. Chemical and physical properties of blood. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P. (Eds.), *Fish Physiology: The Cardiovascular System*, v. 12A. Academic Press, New York, pp. 55-133, 1992.
- MILL, J.G.; VASSALLO, D.V. & LEITE, C.M. Mechanism underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Brasilian J. Med. Biol. Res.*, v. 25, pp. 399-408, 1992.
- MILLIGAN, C.L.; GRAHAM, M.S. & FARRELL, A.P. The response of trout red cells to adrenaline during seasonal acclimation and changes in temperature. *J. Fish Biol.*, v. 35, pp. 229-236, 1989.
- MØLLER-NIELSEN, T. & GESSER, H. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling at 20 and 10° C in rainbow trout myocardium. *J. Comp. Physiol. B*, v. 162, pp. 526-534, 1992.
- MUÑOZ-CHÁPULI, R. & HAMLETT, W.C. Epilogue: comparative cardiovascular biology of lower vertebrates. *J. Exp. Zool.*, v. 275, pp. 249-251, 1996.
- NEMETH, E.F. Calcium receptor-dependent regulation of cellular functions. *News Physiol. Sci.*, v.10, pp. 1-5, 1995.
- O'DONNELL, M.E. & OWEN, N.E. Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle. *Physiol. Rev.*, v. 74(3), pp. 683-721, 1994.
- OLLE, C.D. Função cardíaca do teleósteo *Hoplias malabaricus* (teleostei, Erythrinidae) submetidos a diferentes condições térmicas 2003 São Carlos, SP. 75-86p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 2003.
- OPIE, L.H. Cardiac metabolism-emergence, decline, and resurgence – Part I. *Cardiovasc. Res.*, v. 26, pp. 721-733, 1992.
- PEYRAUD-WAITZENEGGER, M.; BARTHELEMY, L. & PEYRAUD, C. Cardiovascular and ventilatory effects of catecholamines in unrestrained eels (*Anguilla anguilla* L.). *J. comp. Physiol.*, v. 138, pp. 367-375, 1980.
- RANDALL, D.J. Functional morphology of the heart in fishes. *Am Zool.*, v. 8, pp.179-189, 1968.

- RANTIN, F.T.; GESSER, H.; KALININ, A.L.; GUERRA, C.D.R.; FREITAS, J.C. & DRIEDZIC, W.R. 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, n. 1, pp. 31-39, 1998.
- REID, S. D.; McDONALD, D.G. & WOOD, C.M. Interactive effects of temperature and pollutant stress. In: Wood, C.M., McDonald, D.G. (Eds.), *Global Warning: Implications for Freshwater and Marine Fish*. Cambridge University Press, London, pp. 325-349, 1997.
- RIVAROLI, L. Respostas cronotrópicas e inotrópicas do miocárdio ventricular de três espécies de peixes tropicais ecologicamente distintas: Curimatá, *Prochilodus lineatus*, traíra, *Hoplias malabaricus*, e cascudo, *Hypostomus regani*. São Carlos, SP. 62-67p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 2002.
- ROBINS, C.R.; BAILEY, R.M.; BOND, C.E.; BROOKER, J.R.; LACHNER, E.A.; LEA R.N. & SCOTT, W.B. World fishes important to North Americans. Exclusive of species from the continental waters of the United States and Canada. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, v. 243, pp. 91, 1991.
- RUBEN, J. A. & BENNETT, A. F. Intense exercise, bone structure and blood calcium levels in vertebrates. *Nature*. v. 291, pp. 411-413, 1981.
- SANTER, R.M. Morphology and innervation of the fish heart. *Adv. Anay. Embryol. Cell. Biol.*, v. 89, pp. 1-102, 1985.
- SATHER, B. T. & ROGERS, T. A. Some inorganic constituents of the muscles and blood of the oceanic skipjack, *Katsuwonis pelamis*. *Pac. Sci.* v. 21, pp. 404-413, 1967.
- SCHEUERMANN, D.W. Comparative morphology, cytochemistry and innervation of chromafin tissue in vertebrates. *J. Anat.*, v. 183, pp. 327-342, 1993.
- SHIELS, H. A. & FARRELL, A.P. The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing calcium 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.*, Part A, v. 125, pp. 331-341, 2000.
- SHIELS, H.A., FREUND, E.V., FARRELL, A.P. & BLOCK, B.A., The sarcoplasmic reticulum plays a major role in isometric contraction in atrial muscle of yellowfin tuna. *J. Exp. Biol.*, v. 202, pp. 881-890, 1999.
- SHIELS, H.A., VORNANEN, M., FARRELL, A.P. The force-frequency relationship in fish hearts - A review. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 132(A), pp. 811-826, 2002.
- SITSAPESAN, R.; MONTGOMERY, R.A. P.; MacLEOD, K.T. & WILLIAMS, A.J. Sheep cardiac sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release channel: modifications of conductance and gating by temperature. *J. Physiol.*, v. 434, pp. 469-488, 1991.
- STALEY, N.A. & BENSON, E.S. Ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanisms of excitation-contraction coupling. *J. Cell Biol.*, v.38, pp. 99-114, 1968.
- THOMAS, M.J.; HAMMAN, B.N. & TIBBITS, G.F. Dihydropyridine and ryanodine binding in ventricles from rat, trout, dogfish and hagfish. *J. exp. Biol.*, v. 199, pp. 1999-2009, 1996.
- TIBBITS, G.F. Towards a molecular explanation of the high performance of the tuna heart. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 113A, pp. 77-82, 1996.
- TIBBITS, G.F., PHILIPSON, K.D. & KASHIHARA, H. Characterization of myocardial  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchange in rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, v. 262, pp. C411-C417, 1992b.
- TIBBITS, G.F.; HOVE-MADSEN, L. & BERS, D.M. Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts: a comparison with higher vertebrates. *Can. J. Zool.*, v. 69, pp. 2014-2019, 1991.
- TIBBITS, G.F.; KASHIHARA, H.; THOMAS, M.J.; KEEN, J.E. & FARRELL, A.P.  $Ca^{2+}$  transport in myocardial sarcolemma from rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, v. 259, n. 28, pp. R453-R460, 1990.
- TIBBITS, G.F.; MOYES, C.D. & HOVE-MADSEN, L. Excitation-contraction coupling in the teleost heart. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. & FARRELL, A.P. *Fish*

- Physiology: The Cardiovascular System*. v. 12A. New York: Academic Press Inc., p. 267-303, 1992a.
- TIITU, V. & VORNANEN, M. Regulation of cardiac contractility in a cold stenothermal fish, the burbot, *Lota lota* L. *J. Exp. Biol.*, v. 205, pp. 597-606, 2002.
- TIITU, V. & VORNANEN, M. Ryanodine and dihydropyridine receptor binding in ventricular cardiac muscle of fish with different temperature preferences. *J. Comp. Physiol. B*, v. 173, p. 285-291, 2003.
- TIRRI, R. & LEHTO, H. Alpha- and beta-adrenergic control of contraction force of perch heart. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 77(C), pp. 301-304, 1984.
- VASSALO, D.V. & MILL, J.G. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. *Acta Physiol. Pharm. Lat. Am.*, v. 38, pp. 99-114, 1988.
- VASSALO, D.V., MILL, J.G. & ABREU, G.R. Control of rest potentiation in the ventricular myocardium by the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange mechanism. *Acta. Physiol. Pharm. Lat. Am.*, v. 40, pp. 129-136, 1990.
- VORNANEN, M. Effect of extracellular calcium on the contractility of warm- and cold-acclimated crucian carp heart. *J. Comp. Physiol. B*, v. 165, pp. 507-517, 1996a.
- VORNANEN, M. Excitation-contraction coupling of the developing rat heart. *Molec. Cell Biochem.*, v.5, n.11, pp. 163-194, 1996b.
- VORNANEN, M. Regulation of contractility of the fish (*Carassius carassius* L.) heart ventricle. *Comp. Biochem. Physiol.*: v. 94(C), n.2, p.477-483. 1989.
- VORNANEN, M. Sarcolemmal Ca influx through L-type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish. *Am. J. Physiol.*, v. 272, n. 41, pp. R1432-R1440, 1997.
- VORNANEN, M. Seasonal and temperature-induced changes in myosin heavy chain composition of crucian carp hearts. *Am. J. Physiol.*, v. 267, n. 36, pp. R1567-R1573, 1994.
- VORNANEN, M., SHIELS, H. & FARREL, A.P. Plasticity of excitation-contraction coupling in fish cardiac myocytes. *Comp. Bioch. Physiol. Part A*. v. 132, pp. 827-846, 2002.
- WIER, W.G. Cytoplasmic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in mammalian ventricle: Dynamic control by cellular processes. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 52, pp. 467-485, 1990.

