

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

**CONTRIBUIÇÃO RELATIVA DO CÁLCIO EXTRACELULAR E
DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE FORÇA DE CONTRAÇÃO CARDÍACA
DE JEJU, *Hoplerythrinus unitaeniatus***

JACQUELINE APARECIDA RATTO ZANON

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
2005

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

Z33cr

Zanon, Jacqueline Aparecida Ratto.

Contribuição relativa do cálcio extracelular e do retículo sarcoplasmático para o desenvolvimento de força de contração cardíaca de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* / Jacqueline Aparecida Ratto Zanon. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

76 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Fisiologia comparada. 2. Retículo sarcoplasmático. 3. Tiras ventriculares. 4. Relação força – frequência. 5. Miocárdio ventricular. I. Título.

CDD: 591.1 (20^a)

ORIENTADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin

A Deus, por sempre iluminar meu caminho...

AGRADECIMENTOS

À querida Prof^a. Dra. Ana Lúcia Kalinin, pela orientação, competência, paciência e amizade, tornando prazeroso o meu trabalho.

À minha grande amiga Monica, pela co-orientação, carinho, dedicação, amizade e companheirismo, em todos os momentos.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite, analisado o trabalho e colaborado muito com suas sugestões.

Ao amigo Cláudio, pela fundamental contribuição desde o início dos experimentos, me socorrendo quando necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À Eliane, Fábio, Laila, Charles, Valéria, e todos os colegas do DCF, pelo agradável convívio.

Em especial ao Sr. Nelson A. Matos (*in memoriam*), e ao José Roberto, pela grande ajuda prestada.

Ao meu filho Lucca pela compreensão em muitos momentos em que foi privado da minha companhia.

Aos meus pais Nicola e Vanda, pois sem eles eu não teria chegado até aqui e não teria a base para chegar ainda aonde quero.

Aos meus irmãos Júnior e Joseli, pelo carinho e confiança que depositaram em mim neste projeto.

Ao meu marido Willian, pela paciência e compreensão nas horas difíceis, e pelo companheirismo.

À Flávia e Suzana, pelas horas em cuidaram do meu baixinho para que eu pudesse me dedicar aos experimentos.

Ao corpo docente e aos funcionários do departamento de Ciências Fisiológicas.

A todos aqueles que apesar de não citados, ajudaram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser concluído.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Acoplamento Excitação-Contração Cardíaco	2
1.2. Relaxamento Cardíaco	6
1.3. Objetivos	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Material	10
2.1.1. Posição Sistemática da Espécie	10
2.1.2. Breves Considerações Sobre a Espécie Estudada	11
2.2. Métodos	12
2.2.1. Coleta e Manutenção em Laboratório	12
2.2.2. Preparações Experimentais	12
2.2.2.1. Experimentos <i>In Vivo</i>	12
2.2.2.2. Experimentos <i>In vitro</i>	14
2.2.3. Protocolos Experimentais	15
2.2.3.1. Efeito do Tempo de Exposição	15
2.2.3.2. Efeito do Aumento da Concentração de Cálcio	15
2.2.3.3. Efeito da Rianodina em Steady-State	16
2.2.3.4. Efeito da Adrenalina em Steady-State	17
2.2.3.5. Tensão Pós-Pausa	17
2.2.3.6. Relação Força-Freqüência	18
2.3. Análise dos Resultados	19
2.3.1. Forma de Apresentação dos Dados	19
2.3.2. Tratamento Estatístico dos Dados	20
3. RESULTADOS	21
3.1. Freqüência Cardíaca <i>In Vivo</i>	21
3.2. Efeito do Tempo de Exposição	21
3.3. Efeito do Aumento da Concentração de Cálcio Extracelular	23
3.4. Efeito da Rianodina em Steady-State	25
3.5. Efeito da Adrenalina em Steady-State	27
3.6. Tensão Pós-Pausa	29
3.7. Efeito do Aumento da Freqüência de Estimulação	31
3.7.1. Controle	31
3.7.2. Rianodina	34
3.7.3. Baixa Adrenalina + Rianodina	37
3.7.4. Alta Adrenalina + Rianodina	40
3.8. Freqüências <i>In Vivo</i> e <i>In Vitro</i>	43
3.9. Comparação Entre os Diferentes Tratamentos	45
4. DISCUSSÃO	51
4.1. Experimento <i>In Vivo</i>	51
4.1.1. Freqüência Cardíaca	51
4.2. Experimentos <i>In Vitro</i>	51
4.2.1. Efeito do Tempo de Exposição	51
4.2.2. Aumento da Disponibilidade de Cálcio Extracelular	52
4.2.3. Tensão Pós-Pausa	54
4.2.4. Efeito da Adrenalina	58
4.2.5. Efeitos de Incrementos na Freqüência de Estimulação	61
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Valores da força de contração (F_c – mN/mm^2), tempo para o pico de força (TPT – ms) e tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus*, ($n = 10$) na temperatura de 25°C durante um período de 40 min. Valores médios ± 1 E.P.M.....22
- TABELA 2 - Valores da força de contração (F_c - % dos valores iniciais), tempo para o pico de força (TPT – % dos valores iniciais) e tempo para 50% do relaxamento (THR – % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* ($n = 10$), durante aumentos na concentração de cálcio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$ – mM). Valores médios ± 1 E.P.M. Os asteriscos ao lado das médias indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre o respectivo valor e aquele inicialmente observado ($[\text{Ca}^{2+}]_e = 1,25$ mM) para um mesmo parâmetro.....24
- TABELA 3 - Valores da força de contração (F_c – % do controle), tempo para o pico de força (TPT - % do controle) e tempo para 50% do relaxamento (THR – % do controle) desenvolvidos pelas tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus*, antes (controle) e 40 min após a adição de $10\ \mu\text{M}$ de rianodina à frequência de estimulação de $0,2$ Hz e na temperatura de 25°C . Valores médios ± 1 E.P.M.....26
- TABELA 4 - Valores da força de contração (F_c – % do controle), tempo para o pico de força (TPT - % do controle) e tempo para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares jeju, *H. unitaeniatus* ($n = 12$) em resposta à adição de adrenalina (M) em um meio já contendo $10\ \mu\text{M}$ de rianodina. Valores médios ± 1 E.P.M. Ctrl – controle (meio sem adição de adrenalina, mas com $10\ \mu\text{M}$ de rianodina). a: diferente ($p < 0,05$) do controle; b: diferente ($p < 0,05$) de 10^{-9} M de adrenalina.....28
- TABELA 5 - Tensão pós-reposo (PR), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) desenvolvidos pelas tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* ($n = 12$) na primeira contração após 5 min de repouso (% antes do repouso) em preparações controle e em presença de $10\ \mu\text{M}$ de rianodina. Valores médios ± 1 E.P.M. O asterisco ao lado da média tratada com rianodina indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre aquele parâmetro e seu controle (sem rianodina).....30
- TABELA 6 - Valores da força de contração (F_c – % dos valores iniciais) e dos tempos para atingir o pico de tensão (TPT - % dos valores iniciais) e para que 50% do relaxamento fosse completado (THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* ($n = 10$)) em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - bpm) nas preparações Controle (sem adição de rianodina ou adrenalina). Valores médios ± 1 E.P.M. Os asteriscos ao lado dos valores indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores inicialmente ($0,2$ Hz) registrados para aquele parâmetro.....32
- TABELA 7 - Valores da força de contração (F_c - % do controle), tempo para o pico de força (TPT – % do controle) e tempo para 50% do relaxamento (THR – % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* ($n = 10$), em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações tratadas com $10\ \mu\text{M}$ de rianodina. Valores médios ± 1 E.P.M. Os asteriscos ao lado dos valores indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores inicialmente ($0,2$ Hz) registrados para aquele parâmetro.....35

- TABELA 8 - Valores da força de contração (Fc - % do controle), tempo para o pico de força (TPT - % do controle) e tempo para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10), em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações tratadas com 10^{-9} M de adrenalina + $10\mu\text{M}$ de rianodina. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os asteriscos ao lado dos valores indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores inicialmente (0,2 Hz) registrados para aquele parâmetro.....38
- TABELA 9 - Valores da força de contração (Fc - % do controle), tempo para o pico de força (TPT - % do controle) e tempo para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10), em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações tratadas com 10^{-6} M de adrenalina + $10\mu\text{M}$ de rianodina. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os asteriscos ao lado dos valores indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores inicialmente (0,2 Hz) registrados para aquele parâmetro.....41
- TABELA 10 - Valores médios da frequência cardíaca (f_H) observada *in vivo* (*In Vivo*) e frequência de estimulação máxima (bpm) na qual 70% das tiras ventriculares foram capazes de se contrair regularmente nas preparações controle (CTRL) e naquelas tratadas com rianodina (RIAN), baixa adrenalina (BA + RIAN) ou alta adrenalina (AA + RIAN) para jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10).....44
- TABELA 11 - Parâmetros (força de contração - Fc; tempo para o pico de tensão - TPT; tempo para 50% do relaxamento - THR) para os quais foi identificada uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos quando considerada a mesma frequência de estimulação para as tiras ventriculares de jeju (n = 10). Os valores médios dos parâmetros analisados estão apresentados nas tabelas 6, 7, 8 e 9. Ctrl \neq Rian: diferença ($p < 0,05$) entre controle (sem rianodina ou adrenalina) e rianodina ($10\mu\text{M}$); Ctrl \neq BA+Rian: diferença ($p < 0,05$) entre controle e baixa adrenalina (10^{-9} M de adrenalina + $10\mu\text{M}$ de rianodina), Ctrl \neq AA+Rian: diferença ($p < 0,05$) entre controle e alta adrenalina (10^{-6} M de adrenalina + $10\mu\text{M}$ de rianodina); Rian \neq BA+Rian: diferença ($p < 0,05$) entre rianodina e baixa adrenalina; Rian \neq AA+Rian: diferença ($p < 0,05$) entre rianodina e alta adrenalina; BA+Rian \neq AA+Rian: diferença ($p < 0,05$) entre baixa e alta adrenalina; NS: diferença não significativa ($p > 0,05$) para nenhum tratamento.....50

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Fotomicrografia eletrônica de um corte transversal do miócito ventricular de carpa cruciana, *Carassius carassius* (aumento de 12.000 vezes). As setas apontam para o RS, pobremente desenvolvido. Notar o pequeno diâmetro dos miócitos ($5,78 \pm 0,11 \mu\text{m}$), associado à ausência de túbulos-T e à disposição periféricas das miofibrilas (modificado de VORNANEN, 1997).....2
- FIGURA 2 - Esquema geral do mecanismo de acoplamento E-C do músculo cardíaco, comparando o modelo existente em mamíferos (A) com o proposto para teleósteos (B). A figura também ilustra algumas diferenças entre a estrutura dos miócitos de peixes e mamíferos, como variações no diâmetro das células, distribuição e abundância do RS e existência de túbulos-T. As linhas pontilhadas sugerem um possível papel das fontes de cálcio. DHPR: canal de dihidropiridina; SL: sarcolema; RS: retículo sarcoplasmático (modificado de TIBBITS et al., 1992a).....4
- FIGURA 3 - Jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*.....10
- FIGURA 4 - Esquema do sistema experimental utilizado nos experimentos *in vivo*. a: tanque experimental; b: câmara de contenção; c: visor acrílico; d: eletrodo ativo; e: eletrodo de referência; f: eletrodo terra; g: fluxômetro de gás; h: termostato; i: reservatório de água; j: bomba para circulação de água no tanque experimental. As setas indicam a direção de fluxo de água no sistema (modificado de KALININ, 1996).....13
- FIGURA 5 - Esquema da preparação utilizada para as medidas da contração das tiras ventriculares (modificado de COSTA, 2004).....15
- FIGURA 6 - Representação do registro de força de contração isométrica antes e depois de uma pausa diastólica prolongada, mostrando a potenciação da mesma (modificado de ANELLI Jr, 2002).....18
- FIGURA 7 - Esquema mostrando as variáveis medidas no registro de força de contração isométrica no presente estudo. Fc: Força de contração; TPT: Tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: Tempo necessário para que ocorra 50 % do relaxamento (modificado de ANELLI Jr, 2002).....20
- FIGURA 8 - Efeito do tempo de exposição (40 min) sobre a força de contração (Fc - % dos valores iniciais) e sobre os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10) na temperatura de 25 °C. As barras verticais representam os valores médios de TPT e THR + 1 E.P.M, enquanto os triângulos representam os valores médios de Fc ± 1 E.P.M.....22
- FIGURA 9 - Efeito dos aumentos na concentração de cálcio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$ - mM) sobre a força de contração (Fc - % dos valores iniciais), o tempo para o pico de força (TPT - % dos valores iniciais) e o tempo para 50% do relaxamento (THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10). As barras verticais representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de TPT e THR ± 1 E.P.M.....24
- FIGURA 10 - Valores normalizados (% do controle) da força de contração (Fc), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 12) antes (controle; Ctrl) e 40 min após a adição de 10 μM de rianodina (Ryan). As barras verticais representam os valores médios de TPT e THR + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de Fc ± 1 E.P.M. O asterisco sobre o retângulo denota uma diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à Fc inicialmente observada...26

- FIGURA 11 - Valores normalizados (% controle: sem adrenalina, mas com 10 μ M de rianodina) da força de contração (Fc), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares de jeju após a adição de 10^{-9} M de adrenalina (BA) ou de 10^{-6} M de adrenalina (AA). As barras verticais representam os valores médios de TPT e THR + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M..... 28
- FIGURA 12 - Efeito de uma pausa diastólica de 5 min sobre a tensão pós-reposo (PR), os tempos para o pico de tensão (TPT) e para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus*, em preparações controle (n = 12) e tratadas com 10 μ M de rianodina (n = 10), representados como uma porcentagem dos valores observados na última contração antes da pausa (% antes da pausa). As barras representam valores médios + 1 E.P.M. O asterisco acima da barra vertical indica alteração (p < 0,05) em relação ao valor precedente à pausa, enquanto o asterisco acima da linha horizontal denota uma diferença (p < 0,05) entre controle e rianodina.....30
- FIGURA 13 - Efeito do aumento da freqüência de estimulação (Hz) sobre os valores da força de contração (Fc - % dos valores iniciais), dos tempos para o pico de tensão (TPT - % dos valores iniciais) e para 50% do relaxamento (THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10) em preparações Controle (sem adição de rianodina ou adrenalina). As barras verticais representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de TPT e THR \pm 1 E.P.M.....33
- FIGURA 14 - Efeito do aumento da freqüência de estimulação (Hz) sobre os valores da força de contração (Fc - % do controle), os tempos para o pico de tensão (TPT - % do controle) e para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju (n = 10) em preparações tratadas com 10 μ M de rianodina. As barras verticais representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de TPT e THR \pm 1 E.P.M.....36
- FIGURA 15 - Efeito do aumento da freqüência de estimulação (Hz) sobre os valores da força de contração (Fc - % do controle), os tempos para o pico de tensão (TPT - % do controle) e para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju (n = 10) em preparações tratadas com 10^{-9} M de adrenalina + 10 μ M de rianodina (BA+RYAN). As barras verticais representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de TPT e THR \pm 1 E.P.M.....39
- FIGURA 16 - Efeito do aumento da freqüência de estimulação (bpm) sobre os valores da força de contração (Fc - % do controle), os tempos para o pico de tensão (TPT - % do controle) e para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10) em preparações tratadas com 10^{-6} M de adrenalina + 10 μ M de rianodina. As barras verticais representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de TPT e THR \pm 1 E.P.M.....42
- FIGURA 17 - Diagrama comparativo entre os valores médios da freqüência cardíaca observada *in vivo* (*In Vivo*) com a freqüência de estimulação máxima (bpm) na qual 70% das tiras ventriculares foram capazes de se contrair regularmente nas preparações controle (CTRL) e naquelas tratadas com rianodina (RIAN), baixa adrenalina (BA + RIAN), ou alta adrenalina (AA + RIAN) para jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10).....44

- FIGURA 18 - Diagrama comparativo entre o efeito dos tratamentos CTRL (sem adição de rianodina ou adrenalina), RIAN (10^{-6} μ M de rianodina), BA + RIAN (10^{-9} M de adrenalina + 10^{-6} μ M de rianodina) e AA + RIAN (10^{-6} M de adrenalina + 10^{-6} μ M de rianodina) sobre a força de contração (Fc – %) durante incrementos da frequência de estimulação imposta sobre as tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10). Os pontos representam os valores médios \pm 1 E.P.M.. Comparação estatística na tabela 11. A seta indica a faixa de frequência cardíaca registra *in vivo* para a espécie (valor médio).....47
- FIGURA 19 - Diagrama comparativo entre o efeito dos tratamentos CTRL (sem adição de rianodina ou adrenalina), RIAN (10^{-6} μ M de rianodina), BA + RIAN (10^{-9} M de adrenalina + 10^{-6} μ M de rianodina) e AA + RIAN (10^{-6} M de adrenalina + 10^{-6} μ M de rianodina) sobre o tempo para atingir o pico de tensão (TPT – %) durante incrementos da frequência de estimulação imposta sobre as tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10). Os pontos representam os valores médios \pm 1 E.P.M. Comparação estatística na tabela 11. A seta indica a faixa de frequência cardíaca registra *in vivo* para a espécie (valor médio).....48
- FIGURA 20 - Diagrama comparativo entre o efeito dos tratamentos CTRL (sem adição de rianodina ou adrenalina), RIAN (10^{-6} μ M de rianodina), BA + RIAN (10^{-9} M de adrenalina + 10^{-6} μ M de rianodina) e AA + RIAN (10^{-6} M de adrenalina + 10^{-6} μ M de rianodina) sobre o tempo para que 50% do relaxamento fosse completado (THR – %) durante incrementos da frequência de estimulação imposta sobre as tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10). Os pontos representam os valores médios \pm 1 E.P.M. Comparação estatística na tabela 11. A seta indica a faixa de frequência cardíaca registra *in vivo* para a espécie (valor médio).49

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo analisar as respostas *in vivo* e *in vitro* do miocárdio de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, na temperatura de aclimatação (25 °C) em relação a diferentes concentrações de cálcio extracelular e adrenalina, e na presença e ausência de rianodina. Os registros de frequência cardíaca *in vivo* (f_H – bpm) foram realizados através da implantação de eletrodos na região cardíaca do animal para registros eletrocardiográficos. Adicionalmente foram realizados registros *in vitro* das respostas inotrópicas (Fc) 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, concentrações extracelulares de cálcio, adrenalina e rianodina (bloqueadora da função do retículo sarcoplasmático). *In vivo*, a f_H obtida foi $29,3 \pm 0,31$ bpm. A adição de concentrações crescentes de cálcio (1,25 até 9,25 mM) ao banho causou aumento da Fc a partir de 5,25 mM. Tanto o TPT quanto o THR se mantiveram inalterados durante o experimento. A análise da tensão pós-pausa, com e sem 10 μ M de rianodina, revelou uma significativa potenciação da força nas preparações controle (de 100,0 para $168,3 \pm 11,4$ %), a qual foi inibida pela rianodina ($108,6 \pm 4,7$ %). Quedas na Fc em preparações controle foram observadas a partir da frequência de 0,4 Hz. O TPT e o THR sofreram reduções significativas quando comparados aos valores obtidos inicialmente. O tratamento com rianodina provocou uma diminuição na Fc somente na última frequência atingida (1,2 Hz - 38%), enquanto o TPT sofreu redução significativa a partir da frequência de 0,6 Hz (28%) e o THR não foi alterado. A combinação entre rianodina e baixa concentração de adrenalina (10^{-9} M), causou uma diminuição da Fc a partir da frequência de 0,6 Hz (20%), além de redução significativa do TPT a partir da frequência de 0,6 Hz (15%), enquanto o THR não se alterou. A combinação entre rianodina e elevada concentração de adrenalina (10^{-6} M) mostrou que nesta situação, os cardiomiócitos são capazes não apenas de recuperar o inotropismo negativo causado pela rianodina, mas de superar a Fc observada no controle (aumento de $\cong 75\%$) enfatizando a importância do influxo de cálcio através da sarcolema. Neste caso, o aumento da Fc foi acompanhado por valores inalterados de TPT e THR. Os dados revelaram que o cálcio responsável pela ativação dos miofilamentos deve derivar de pelo menos duas fontes: os espaços extracelulares (evidenciado pelo aumento de Fc durante incrementos na concentração de cálcio 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 ventricular myocardium obtained from *Hoplerythrinus unitaeniatus* acclimated and tested at 25 °C. The *in vivo* heart rate (f_H – bpm) was obtained (ECG recordings at lead D₁ of the electrocardiography) from electrodes inserted at cardiac region. Recordings of the isometric contraction force (Fc – %) 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 changes in stimulation frequency, extracellular Ca^{2+} and adrenaline concentrations, and ryanodine (blocker of the sarcoplasmic reticulum – SR). The species presented resting f_H values of 29.3 ± 0.31 bpm. The increase in twitch force following addition of crescent Ca^{2+} concentrations to the medium evidenced the importance of the extracellular Ca^{2+} for the heart contraction. Significant changes in the time-dependent parameters after increments in the Ca^{2+} extracellular concentration were not recorded. The post rest tension was analyzed with and without addition of 10 μ M ryanodine to the medium. A significant post rest potentiation was recorded for the control preparations (100 to 168.3 ± 11.44 %). However, this post rest potentiation was inhibited by ryanodine (100 to 108.6 ± 4.7 %). The impact of increases in the imposed contraction frequency caused a decline of Fc, TPT and THR in frequencies ≥ 0.4 Hz. During increases in frequency, the pre-treatment with ryanodine decreased force only at the highest frequency (38 % at 1.2 Hz), while TPT decreased at 0.6 Hz and THR remained constant. The combination of ryanodine and a tonic level of adrenaline (10^{-9} M) did not prevent the force decline as frequency was increased. Adrenergic stimulation with a high level of adrenaline (10^{-6} M) after pre-treatment with ryanodine caused positive inotropy in a magnitude that ameliorated the negative inotropic effect of ryanodine. In conclusion, *H. unitaeniatus* seems to present well-developed intracellular stores of activator Ca^{2+} , resembling those of mammals rather than of terrestrial ectothermic vertebrates. As a difference, this species also depends on extracellular sources of Ca^{2+} which provide more flexibility to modulate the contraction force.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes são os vertebrados que apresentam maior diversidade e número de espécies. De acordo com WOOTTON (1990), aproximadamente 30.000 espécies de peixes ocupam uma grande diversidade de habitats, que variam amplamente tanto em relação às condições abióticas (temperatura, O₂ dissolvido, pH, profundidade, iluminação etc) quanto bióticas (disponibilidade de alimento, competição, predação etc). Tais características fazem com que a demanda imposta ao coração desses animais varie consideravelmente, resultando em uma ampla gama de modificações na morfologia e fisiologia de seus sistemas cardiovasculares (TIITU, 2002).

Os regimes ambientais de ampla variação aos quais os peixes estão sujeitos impõem a necessidade de regulação da contratilidade cardíaca e, conseqüentemente do acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C). A temperatura provavelmente constitui-se no fator ambiental predominante (BENNETT, 1984), apesar de estudos acerca de sua influência sobre a contratilidade cardíaca terem sido quase exclusivamente desenvolvidos com espécies endotérmicas, nas quais o músculo cardíaco trabalha *in vivo* em uma temperatura essencialmente constante (HOVE-MADSEN, 1992).

Apesar da maioria dos estudos analisando a performance cardíaca de peixes e os processos a ela relacionados terem sido desenvolvidos com espécies de ambiente temperado (HOVE-MADSEN et al., 1998, 2001; BAILEY et al., 2000; HARWOOD et al., 2000; SHIELS & FARRELL, 2000; HOVE-MADSEN et al, 2001; TIITU & VORNANEN, 2002, 2003; VORNANEN et al., 2002) estudos mais recentes realizados com peixes de ambientes tropicais (COSTA et al., 2000, 2002, 2004; RIVAROLI, 2002; OLLE, 2003; ANELLI Jr. et al., 2004) indicam haver importantes diferenças no modo como se dá o acoplamento E-C cardíaco de acordo com o ambiente térmico em questão, bem como conseqüência da amplitude de variação térmica à qual o animal é sazonal ou diariamente submetido em seu ambiente natural. Assim, torna-se imprescindível ampliar o conhecimento de mais espécies tropicais, o que se constitui na proposta do presente estudo.

1.1. Acoplamento Excitação-Contração Cardíaco

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 (SL) e também de sua liberação e tomada pelo retículo sarcoplasmático (RS), torna-se imprescindível o conhecimento do acoplamento E-C em peixes.

Segundo 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, 2001). Porém, distinções anatômicas e estruturais existentes no coração de peixes, como um RS esparso, ausência de túbulos transversos (túbulos-T), miócitos relativamente pequenos e miofibrilas periféricamente arranjadas, são a base de importantes diferenças fisiológicas, particularmente em relação à origem do cálcio a ser utilizado pelo aparato contrátil (TIBBITS et al., 1991; figura 1).

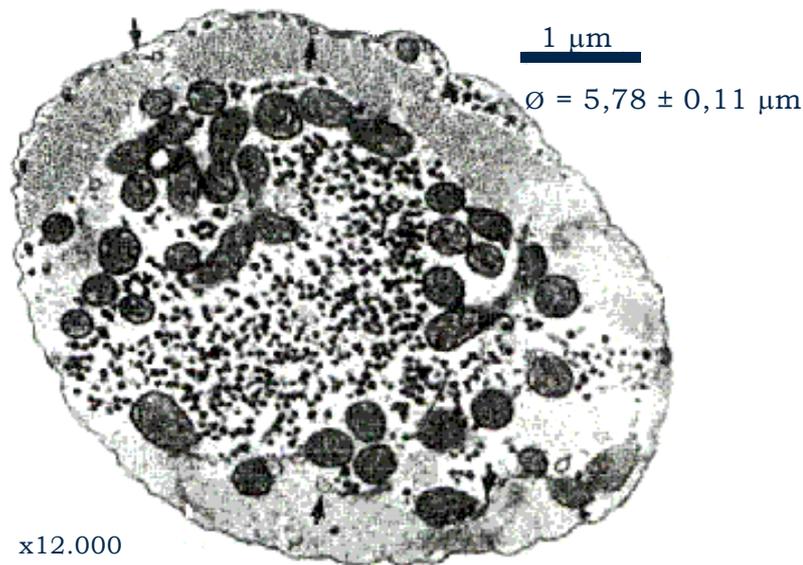


FIGURA 1 - Fotomicrografia eletrônica de um corte transversal do miócito ventricular de carpa cruciana, *Carassius carassius* (aumento de 12.000 vezes). As setas apontam para o RS, pobremente desenvolvido. Notar o pequeno diâmetro dos miócitos ($5,78 \pm 0,11 \mu\text{m}$), associado à ausência de túbulos-T e à disposição periféricas das miofibrilas (modificado de VORNANEN, 1997).

FABIATO (1983) propôs que, em mamíferos, o influxo transsarcolemal de cálcio, através da troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e de canais voltagem-dependentes tipo L (lentos), dispara a liberação de uma quantidade ainda maior deste íon do RS, através de canais de cálcio denominados canais de rianodina, mecanismo denominado liberação de cálcio cálcio-induzida (BERS, 1991; FRANK et al., 2003). No entanto, a quantidade de cálcio removida da célula durante o relaxamento é a mesma que entra pela SL a cada batimento, sendo que a célula não ganha nem perde íons cálcio (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 (CHAPMAN, 1983; BERS, 2001). Assim, o cálcio liberado do RS constitui a 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 (figura 2). 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).

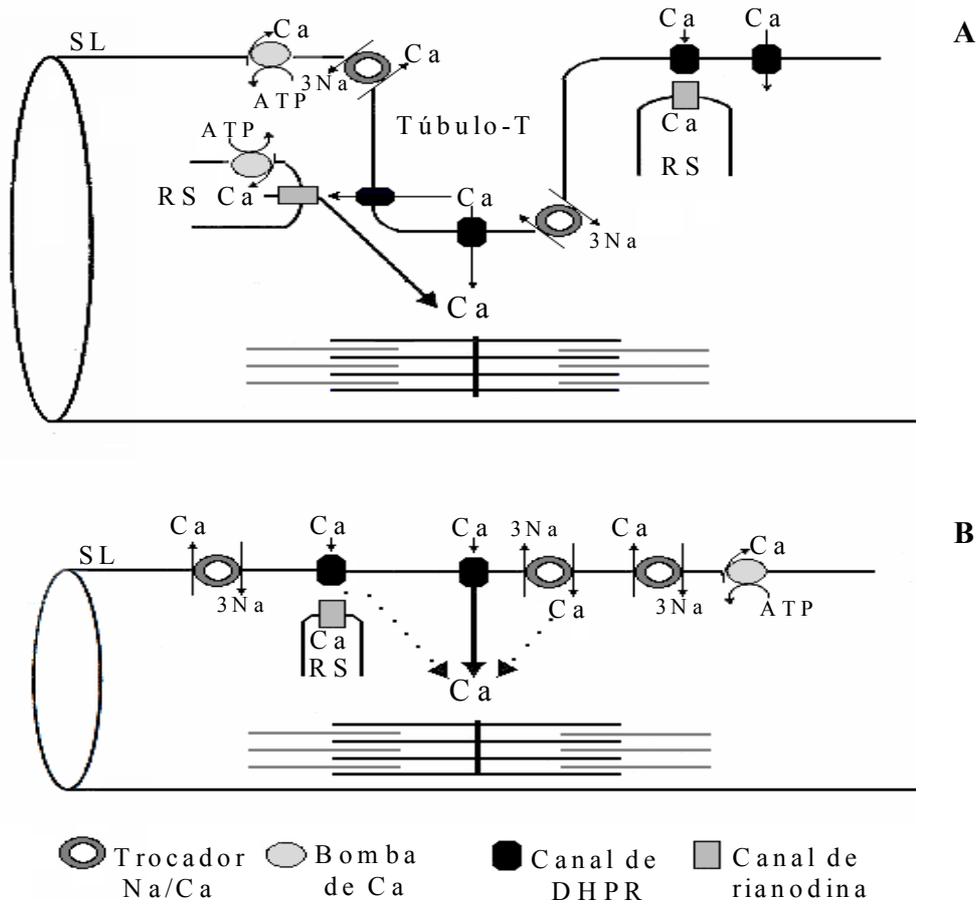


FIGURA 2 - Esquema geral do mecanismo de acoplamento E-C do músculo cardíaco, comparando o modelo existente em mamíferos (A) com o proposto para teleósteos (B). A figura também ilustra algumas diferenças entre a estrutura dos miócitos de peixes e mamíferos, como variações no diâmetro das células, distribuição e abundância do RS e existência de túbulos-T. As linhas pontilhadas sugerem um possível papel das fontes de cálcio. DHPR: canal de dihidropiridina; SL: sarcolema; RS: retículo sarcoplasmático (modificado de TIBBITS et al., 1992a).

A contração ventricular tanto em anfíbios (BERS, 1985) quanto na maioria dos teleósteos (HOVE-MADSEN & GESSER, 1989; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992, KEEN et al., 1994; GESSER, 1996; RANTIN et al., 1998; COSTA, 2000) 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 transarcolemal 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. Essa 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).

Por meio dos argumentos anteriores, pode-se constatar que, embora o miocárdio ventricular dos peixes teleósteos contenha basicamente todos os componentes celulares para o acoplamento E-C observados em mamíferos, a interação exata e o papel desempenhado por cada um dos componentes na geração de força ainda não foram totalmente elucidados. Em particular, a importância relativa das fontes de cálcio para a ativação contrátil no miocárdio ventricular dos teleósteos (i.e., influxo transarcolemal *versus* liberação pelo RS) não foi claramente definida e apresenta peculiaridades que variam entre as espécies (COSTA et al., 2000; ANELLI JR et al., 2004).

Além disso, estudos ultraestruturais indicaram haver uma variabilidade interespecífica na estrutura e complexidade do RS do coração de teleósteos oriundas não apenas de diferenças quanto ao grau de desenvolvimento desta organela, como também da sua capacidade de armazenamento de cálcio, densidade e disposição dos canais de rianodina, subtipos e diferenciação da atividade de bombas e canais iônicos (TIITU & VORNANEN, 2003).

1.2. Relaxamento Cardíaco

TIBBITS et al. (1992a) destacam que, teoricamente, a diminuição do cálcio livre pode ser obtida por sistemas de transporte localizados em 3 diferentes compartimentos: 1) a bomba de cálcio do RS; 2) o NCX e a bomba de cálcio (Ca^{2+} -ATPase) da SL; e, 3) a mitocôndria.

No coração de mamíferos, a bomba de cálcio do RS e o NCX da SL 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, cerca de 70% do cálcio é removido pelo RS através da bomba e, o restante, pelo NCX sarcolemal. Além disso, a bomba de cálcio da SL e a tomada mitocondrial de cálcio 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 transarcolemaal relativamente grande de cálcio é removido do citosol, durante o relaxamento cardíaco, basicamente através do NCX e da bomba de cálcio sarcolemais (THOMAS et al., 1996), o primeiro 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 SL.

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, evidenciando uma menor capacidade de obtenção de cálcio livre a partir de reservas intracelulares nestes animais, associada a

mecanismos sarcolemais de transporte deste íon insuficientes do ponto de vista funcional para a manutenção do inotropismo a elevadas taxas de estimulação determinando 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 cálcio varia grandemente entre as diferentes espécies. Tal contribuição pode ser examinada utilizando-se a rianodina, que se liga aos canais do RS e inibe a liberação de cálcio. Várias espécies de peixes como a carpa-cruciana (*Carassius carassius* - VORNANEN, 1989), o bacalhau-do-atlântico (*Gadus morhus* – DRIEDZIC & GESSER, 1988), a tilápia-do-nylo (*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) e ~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 cálcio para a contração.

ANELLI JR. (2002), estudando o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, encontrou uma redução de aproximadamente 40% na força de contração (F_c) a 25 °C (frequência de estimulação de 0.2 Hz) após aplicação de rianodina. RIVAROLI (2002), também trabalhando em 25 °C e 0.2 Hz, encontrou reduções na F_c de 39% para a traíra, *Hoplias malabaricus*, 32% para o curimatá, *Prochilodus lineatus* e 17% para o cascudo *Hypostomus regani* após a aplicação de rianodina. A evidência de um retículo sarcoplasmático funcional na temperatura em que a espécie ocorre naturalmente só tinha sido descrita para tiras atriais do atum (KEEN et al., 1992).

Além de demonstrar a funcionalidade do RS sob condições fisiológicas de temperatura e frequência de estimulação, o estudo de RIVAROLI (2002) indica que a relação entre funcionalidade do RS e nível de atividade não é totalmente aplicável para espécies neotropicais, uma vez que a traíra e o cascudo são espécies sedentárias.

Uma hipótese para a presença de RS funcional nas espécies estudadas por RIVAROLI (2002) e ANELLI Jr. (2002) pode ser a posição sistemática em que se encontram. Revisando a filogenia dessas espécies, foi possível se constatar que todas pertencem à superordem OSTARIOPHYSI. Da mesma forma, a carpa, estudada por CHUGUN et al. (1999) também apresentam RS funcional e pertencem a esta superordem, sugerindo que esta seja uma característica comum aos OSTARIOPHYSI, especialmente os neotropicais.

Reforçando essa hipótese, temos que peixes que não apresentaram sensibilidade à rianodina pertencem, em sua maioria a outras superordens de teleósteos. A tilápia-do-nilo, o emborê, o linguado e o sea-raven pertencem à superordem ACANTHOPTERYGII e o bacalhau, insensível à rianodina, e a truta, sensível em condições não fisiológicas, pertencem à superordem PROTOACANTHOPTERYGII.

Exceções a essa regra seriam os membros da família Scombridae. Os atuns *Katsuwonus pelamis* (KEEN et al. 1992) e *Thunnus albacares* (SHIELS et al., 1997) e a cavala *Scomber japonicus* (SHIELS & FARRELL, 2000) apresentaram RS funcional mesmo pertencendo à superordem ACANTHOPTERYGII. Neste caso, porém, a presença de RS funcional parece mais relacionada ao alto grau de atividade de suas espécies, constituindo-se em uma característica adaptativa desta família.

Numa tentativa de ampliar o número de espécies analisadas, o presente trabalho propõe-se a estudar o teleósteo tropical jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, um ostariofíseo de hábito relativamente sedentário, que se encontra amplamente distribuído no Brasil.

1.3. Objetivos

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de elucidar alguns dos mecanismos intracelulares envolvidos com a regulação do cálcio no acoplamento E-C do miocárdio ventricular do teleósteo neotropical jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*. Para tanto, as seguintes respostas foram analisadas:

- a) Respostas cronotrópicas do miocárdio ventricular por meio de registros eletrocardiográficos da frequência cardíaca *in vivo* em condições de repouso, na temperatura de aclimatação (25 °C);
- b) Efeito do tempo (40 minutos) sobre as respostas inotrópicas das tiras ventriculares eletricamente estimuladas a 0,2 Hz a 25 °C para verificar a possível ocorrência de uma deterioração tempo-dependente da força de contração;
- c) Importância do cálcio extracelular para o acoplamento E-C do miocárdio ventricular a 25 °C, por meio do estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de cálcio ao meio extracelular;
- d) Efeito da adrenalina sobre o desenvolvimento de força das tiras ventriculares, analisando as prováveis causas e conseqüências das respostas obtidas.
- e) Efeito de uma pausa diastólica prolongada sobre o desenvolvimento de força das tiras ventriculares da espécie a 25 °C com e sem o tratamento prévio com 10 µM de rianodina, determinando indiretamente a importância do RS a frequências subfisiológicas;
- f) 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 fosse atingido -TPT e para 50 % de relaxamento -THR) de tiras ventriculares em condições controle e submetidas ao tratamento com concentrações tônica (10^{-9} M) e aguda (10^{-6} M) de adrenalina previamente tratadas ou não com 10 µM de rianodina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Foram utilizados 30 espécimes ($Wt = 182,68 \pm 7,12$ g) adultos de ambos os sexos de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (figura 3).

Os fatores determinantes para a escolha desta espécie foram, dentre outros, o fato de ser uma espécie nativa, tipicamente neotropical, sua importância biológica na fauna local, facilidade de coleta e manutenção em condições de laboratório e principalmente, por pertencer à superordem OSTARIOPHYSI. Além disso, a traíra, *Hoplias malabaricus*, também pertencente à família Erythrinidae, já foi estudada por OLLE (2003), oferecendo uma excelente oportunidade para o estudo comparativo da funcionalidade do RS miocárdico de espécies filogeneticamente aparentadas.



FIGURA 3 – Jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*.

2.1.1. Posição Sistemática da Espécie

A espécie em questão ocupa a seguinte posição sistemática (SPIX & AGASSIZ, 1829):

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinoptergii

Divisão: Teleostei

Superordem: Ostariophysi

Ordem: Characiformes

Família: Erythrinidae

Gênero: *Hoplerythrinus*

Espécie: *Hoplerythrinus unitaeniatus*

2.1.2. Breves Considerações Sobre a Espécie Estudada

Segundo GODOY (1975), a família Erythrinidae provavelmente é a mais antiga de todas as Cypriniformes vivas, sendo relativamente pequena entre os Characiformes, por ser composta por três gêneros: *Erythrinus*; *Hoplerythrinus* e *Hoplias*, todos endêmicos às Américas do Sul e Central. Os representantes do gênero *Hoplias*, popularmente conhecidos como traíras e trairões, possuem respiração exclusivamente aquática e representam o gênero mais difundido, ocorrendo em diferentes latitudes. Os dois outros gêneros possuem respiração aérea facultativa (FOWLER, 1950).

Hoplerythrinus unitaeniatus, a única espécie citada para esse gênero, é vulgarmente conhecida por “jeju” (Ceará, Amazonas), “lu” (Piauí), “traíra” e “traíra-pixuna” (NOMURA, 1984). A distribuição geográfica do gênero *Hoplerythrinus* abrange o Peru, Bolívia, Venezuela, Guiana, Paraguai e Brasil (GODOY, 1979). *Erythrinus* e *Hoplerythrinus* são considerados gêneros monotípicos representados, respectivamente, pelas espécies *Erythrinus erythrinus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (GÉRY, 1977).

Hoplerythrinus unitaeniatus é um predador “de espreita”, chegando a medir 35 cm de comprimento. Caracteriza-se por apresentar osso maxilar alongado, com sua extremidade bem atrás da margem posterior do olho; nadadeira dorsal baixa em ambos os sexos; nadadeira caudal plana; faixa escura longitudinal percorrendo o flanco; presença de mancha caudal e ocelo opercular; linha lateral apresentando mais que trinta e duas escamas, e nadadeira dorsal arredondada (AZEVEDO & GOMES, 1943; GERY, 1977).

Do ponto de vista fisiológico, *Hoplerythrinus unitaeniatus* é uma espécie bastante interessante por apresentar como órgão de respiração aérea acessória a bexiga natatória ricamente vascularizada, o que lhe confere uma grande resistência a períodos ocasionais de estiagem (AZEVEDO & GOMES, 1943).

O jeju é bastante semelhante morfológicamente à traíra (*Hoplias malabaricus*), a despeito de não apresentar sua agressividade. É uma espécie bastante resistente, não exigindo freqüentes trocas de água quando mantido em tanques. É usualmente pescado durante o ano todo com redes, peneiras, nos remansos dos rios, corixos e lagoas marginais, especialmente nas margens entre a vegetação aquática. Pode também ser coletado com varas de pesca, linha fina e iscas naturais, como minhocas e pedaços de peixe.

2.2. Métodos

2.2.1. Coleta e Manutenção em Laboratório

Os jejus foram coletados em estações de piscicultura localizadas na cidade de Bataguassu/MS, acondicionados em caixas de transporte com capacidade 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.

Em laboratório, os peixes foram mantidos em tanques de 1000 litros dotados de circulação contínua de água (1,2 l/min) e temperatura controlada (25 ± 1 °C) por, no mínimo, 45 dias. Estudos prévios (KALININ, 1996) demonstraram que esse período é suficiente tanto para a recuperação do estresse decorrente da coleta e transporte, como para a aclimação às condições laboratoriais. Os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada ou filés de peixe fresco, sendo que os animais utilizados nos experimentos *in vivo* tiveram alimentação suspensa 24 horas antes de sua utilização.

2.2.2. Preparações Experimentais

2.2.2.1. 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 0,01% ($C_9H_{11}NO_2$ – 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 do corpo próximo ao coração e o eletrodo negativo foi inserido mais abaixo, na mesma direção do primeiro. Os eletrodos foram suturados com 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_I) da eletrocardiografia padrão.

Após a cirurgia, os animais foram introduzidos em uma câmara de contenção e transferidos para o tanque experimental (figura 4), 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 o protocolo experimental foi desenvolvido. A temperatura foi ajustada por um termostato FAC-TempControl (FAC, São Carlos, SP, Brasil).

Após o período de recuperação, a frequência cardíaca (f_H) foi registrada na temperatura de aclimação (25 °C). Registros com a duração de 5 min foram obtidos a cada 30 min, até que se completassem 2 horas de experimento. A f_H foi expressa em batimentos cardíacos por minutos (bpm).

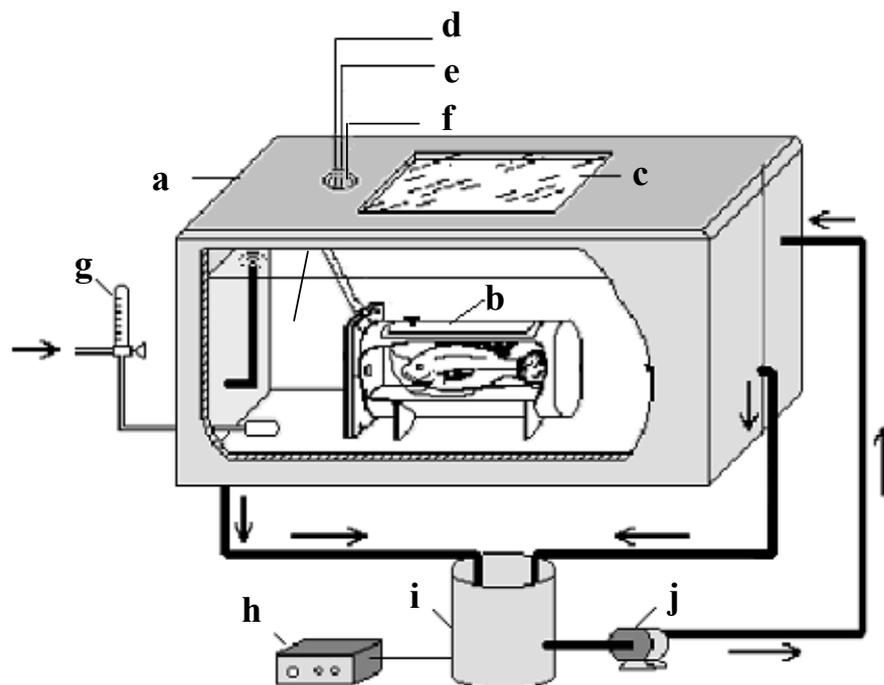


FIGURA 4 - Esquema do sistema experimental utilizado nos experimentos *in vivo*. a: tanque experimental; b: câmara de contenção; c: visor acrílico; d: eletrodo ativo; e: eletrodo de referência; f: eletrodo terra; g: fluxômetro de gás; h: termostato; i: reservatório de água; j: bomba para circulação de água no tanque experimental. As setas indicam a direção de fluxo de água no sistema. (Modificado de KALININ, 1996).

2.2.2.2. 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: 100 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 1,2 mM de MgSO₄, 1,5 mM de NaH₂PO₄, 27 mM de NaHCO₃, 1,25 mM de CaCl₂ e 10 mM de glicose.

Cada tira – com diâmetro de 1 a 2 mm e, no máximo, 0,5 cm de comprimento – foi transferida, imediatamente após a preparação, para um banho contendo 30 ml de solução fisiológica já termostatizada à temperatura de 25 °C e dotado de borbulhamento constante de mistura carbogênica (98 % O₂ e 2 % CO₂ – White Martins) (figura 5). A 25 °C esta solução resultou num pH de 7,4.

Uma extremidade da tira foi fixada, com linha cirúrgica (0,7/6-0 – Ethicon), a um gancho de platina construído na parte terminal de um eletrodo de estimulação.

A outra extremidade foi conectada, também com linha cirúrgica, a um transdutor de força isométrica LETICA TRI 210 (LETICA Scientific Instruments) para que o registro da contração isométrica pudesse ser efetuado por um fisiógrafo Narco 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 AVS 100D (AVS Projetos Especiais), 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.

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 40 minutos, após o qual os diferentes protocolos experimentais foram aplicados, incluindo elevação

da taxa de estimulação, alterações do conteúdo de cálcio e adição de adrenalina e rianodina.

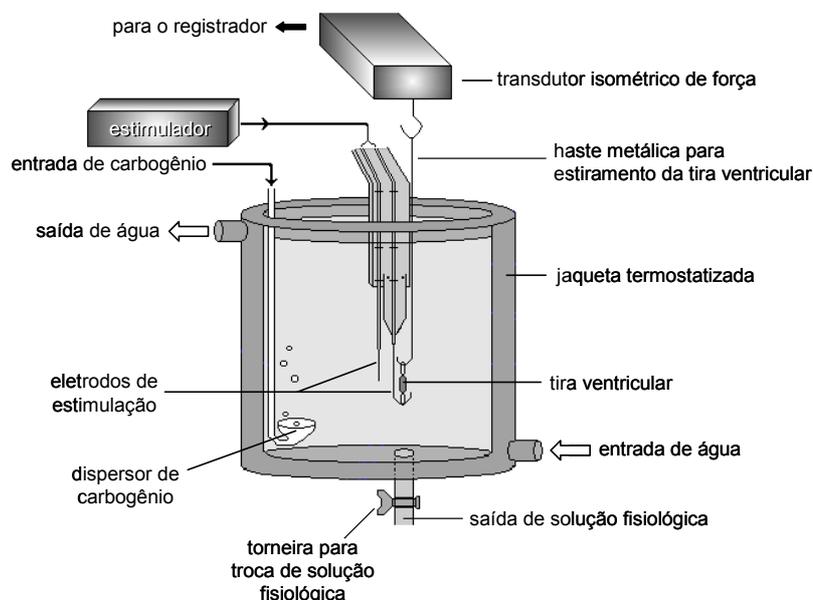


FIGURA 5 - Esquema da preparação utilizada para as medidas da contração das tiras ventriculares (Modificado de COSTA, 2004).

2.2.3. Protocolos Experimentais

Todos os protocolos experimentais descritos abaixo foram realizados na temperatura de aclimação (25 °C).

2.2.3.1. Efeito do Tempo de Exposição

Preparações pares foram mantidas em um banho contendo 1,25 mM de Ca^{2+} durante um período de 40 minutos, durante o qual a força de contração isométrica à taxa de estimulação constante de 0,2 Hz foi registrada ininterruptamente.

Utilizando-se tal protocolo, avaliou-se a possível ocorrência de uma deterioração da força de contração isométrica no decorrer do período experimental.

2.2.3.2. Efeito do Aumento da Concentração de Cálcio

Os pares de tiras ventriculares foram estabilizados a 0,2 Hz em um banho contendo 1,25 mM de CaCl_2 , por um período de aproximadamente 40 min. Após este

período, foram efetuados registros do desenvolvimento de força isométrica das tiras por 3 min. A seguir, as concentrações de CaCl_2 de uma das tiras foram elevadas em 2 mM. Os registros de força de contração isométrica em cada concentração de Ca^{2+} foram realizados até que a mesma produzisse seu efeito completo e, então, eram acrescentados ao banho mais 2 mM de Ca^{2+} . Esse protocolo foi repetido até que não se observasse efeito significativo da nova adição de Ca^{2+} sobre a força contrátil.

2.2.3.3. Efeito da Rianodina em Steady-State

Após o período de estabilização das tiras ventriculares de jeju a 25 °C na frequência de 0,2 Hz, foram adicionados ao banho experimental 10 μM de rianodina ($\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_9$ – Sigma), e as respostas contráteis (Fc) e parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) foram registrados ininterruptamente.

A rianodina foi dissolvida em água destilada em uma concentração adequada e então mantida congelada (-18 °C) já nas doses necessárias para cada experimento a fim de evitar que a mesma fosse descongelada mais de uma vez antes do uso.

THOMAS et al. (1996) propuseram que a rianodina, um alcalóide neutro retirado do vegetal *Ryania speciosa* (JONES et al., 1979), se liga específica e irreversivelmente aos canais de liberação de cálcio do RS e, quando utilizada em concentrações micromolares (10-300 μM), provoca uma diminuição da condutância destes canais ao cálcio (CORONADO et al., 1994), bloqueando-os e assim inibindo a função do RS como fornecedor de cálcio ao aparato contrátil do músculo cardíaco. Dessa forma, a rianodina, na concentração utilizada no presente estudo (10 μM), tem sido amplamente utilizada para o teste da importância funcional do RS no acoplamento E-C de diversos vertebrados, inclusive peixes (DRIEDZIC & GESSER, 1988; TIBBITS et al., 1991; HOVE-MADSEN, 1992; KEEN et al., 1992, 1994; GESSER, 1996; TIBBITS, 1996; VORNANEN, 1996a,b; RANTIN et al., 1998; LILLYWHITE et al., 1999; SHIELS et al., 1999; ANELLI Jr. et al., 2004; COSTA et al., 2004).

Dessa forma, este protocolo foi desenvolvido com o objetivo de verificar um possível papel do RS na ciclagem de cálcio na musculatura ventricular da espécie a uma taxa constante de estimulação.

2.2.3.4. Efeito da Adrenalina em Steady-State

Seguindo-se um período de 40 min após a adição de 10 μ M de rianodina, foram adicionadas ao banho concentrações crescentes de adrenalina ($C_9H_{13}NO_3$ – Merck), a saber: ausência de adrenalina, mas com adição prévia de rianodina (CTRL), 10^{-9} M de adrenalina (BA+RIAN), 10^{-6} M de adrenalina (AA+RIAN). De acordo com SHIELS et al. (1997), estas concentrações de adrenalina correspondem às concentrações deste agonista geralmente observadas no plasma de peixes em condições de repouso e de estresse, respectivamente.

Cada concentração de adrenalina era mantida por um período mínimo de 3 min, ou até que a adrenalina tivesse exercido seu efeito inotrópico completo, sendo que as respostas inotrópicas (Fc) e os processos tempo-dependentes (TPT e THR) foram analisados para cada concentração.

Soluções estoque de adrenalina em concentrações adequadas (10^{-3} e 10^{-4} M) eram previamente preparadas e mantidas sob refrigeração (4 °C). No momento de cada experimento eram acrescentadas ao banho as quantidades necessárias de cada estoque para perfazer as diferentes concentrações utilizadas neste protocolo.

A utilização da adrenalina como o único agonista adrenérgico deveu-se ao fato desta substância, segundo alguns estudos desenvolvidos com peixes (CAMERON & BROWN, 1981; GRAHAM & FARRELL, 1989) ser cerca de 10 vezes mais eficaz que a noradrenalina na estimulação dos β -adrenorreceptores cardíacos de peixes.

2.2.3.5. Tensão Pós-Pausa

Este procedimento foi conduzido com o intuito de fornecer uma noção da capacidade de armazenamento intracelular de Ca^{2+} durante uma pausa diastólica prolongada e não fisiológica.

Inicialmente, os pares de tiras ventriculares foram estimulados a uma taxa constante de 0,2 Hz durante 3 min. Seguiu-se então um período de pausa de 5 min na estimulação elétrica após o qual as tiras foram novamente estimuladas. A primeira contração registrada após o primeiro estímulo foi considerada a tensão pós-pausa, como pode ser observado na figura 6.

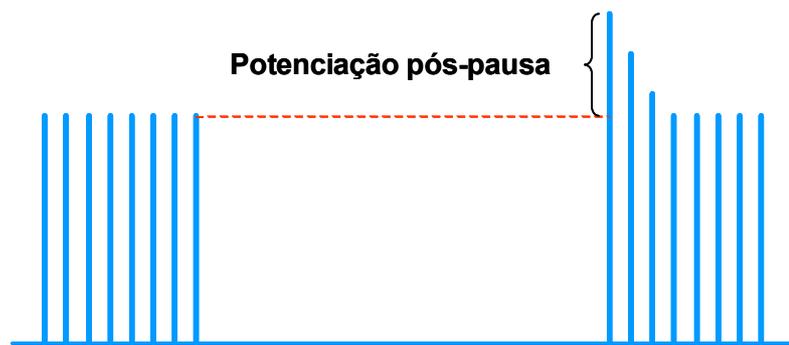


FIGURA 6. Representação do registro de força de contração isométrica antes e depois de uma pausa diastólica prolongada, mostrando a potenciação da mesma. (Modificado de ANELLI-JR, 2002).

Com o objetivo de determinar a importância funcional do RS na espécie, o protocolo experimental acima descrito foi repetido, porém um dos banhos recebeu 10^{-6} M de rianodina 40 min antes do início do experimento.

2.2.3.6. Relação Força-Freqüência

Preparações pares sofreram progressivos aumentos na taxa de estimulação, a partir de 0,2 Hz (12 bpm), até que todos os registros obtidos se tornassem irregulares. Após cada incremento na taxa de estimulação, foram efetuados registros em alta velocidade durante 15-20 segundos para as medidas de possíveis variações na dinâmica do ciclo contração/relaxamento (tempo para o pico de tensão e tempo para 50% do relaxamento). Estas preparações foram denominadas preparações controle (CTRL).

O grau de envolvimento do RS no desenvolvimento de tensão foi avaliado pela aplicação de 10^{-6} M de rianodina às preparações CTRL. Estas preparações passaram a receber o nome de rianodina (RIAN).

Adicionalmente, devido ao fato da adrenalina estar presente em concentrações tônicas nanomolares na circulação de peixes em repouso quando o tônus cardíaco *in vivo* e *in vitro* é preservado (SHIELS & FARRELL, 2000), a série experimental acima descrita foi repetida em presença de 10^{-9} M de adrenalina, considerada como nível tônico (Baixa Adrenalina + Rianodina – BA + RIAN), e 10^{-6} M de adrenalina, correspondente ao nível adrenérgico plasmático durante estimulação adrenérgica máxima (SHIELS & FARRELL, 2000) (Alta Adrenalina + Rianodina – AA + RIAN).

2.3. Análise dos Resultados

2.3.1. Forma de Apresentação dos Dados

Os resultados obtidos no presente estudo serão apresentados como valores médios \pm 1 erro padrão da média (Média \pm 1 E.P.M.) e serão representados da seguinte forma:

- a) Frequência Cardíaca *in vivo* (f_H): expressa em batimentos cardíacos por minuto (bpm).
- b) Força de Contração (Fc): Expressa em porcentagem. Os valores de Fc obtidos em um mesmo protocolo experimental foram normalizados em relação aos valores iniciais, aos quais foram comparados. Adicionalmente, os pontos correspondentes de diferentes protocolos experimentais também foram comparados entre si:
 - Nos experimentos nos quais foi analisado o efeito do tempo, os valores obtidos após 40 minutos foram representados como uma porcentagem da força de contração observada no início do experimento (tempo 0);
 - Nos experimentos nos quais foi analisado o efeito da rianodina e de incrementos na concentração de cálcio extracelular ou de adrenalina, os valores obtidos foram representados como uma porcentagem da força de contração observada na menor concentração extracelular de Ca^{2+} (1,25 mM). Os valores de Fc obtidos na ausência de adrenalina e/ou rianodina (CTRL) foram considerados 100% de força, aos quais foram então normalizados os valores subseqüentemente para os demais tratamentos (RIAN; BA + RIAN e AA + RIAN) nos experimentos de força-frequência (ver abaixo);
 - Tensão Pós-Pausa: os valores da tensão pós-pausa na presença ou ausência de rianodina foram dados como uma porcentagem da última contração registrada anteriormente ao repouso (pré-pausa).
 - Nos experimentos nos quais foi analisado o efeito do aumento da frequência de estimulação das tiras ventriculares sobre o desenvolvimento de força (CTRL), os valores obtidos nas diferentes frequências foram dados como uma porcentagem da força de contração observada na menor frequência (0,2 Hz ou 12 bpm).
- c) Cinética da Contração:
 - Tempo para o Pico de Tensão (TPT – Time to Peak Tension): expresso em porcentagem. 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): valores expressos em porcentagem e analisados como descrito para o TPT.

A representação de um registro de contração isométrica obtido em alta velocidade é mostrada na figura 7.

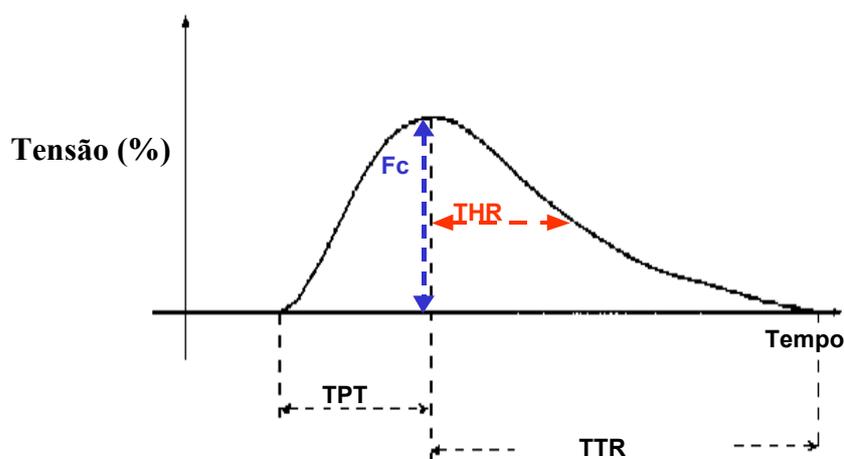


FIGURA 7 - Esquema mostrando as variáveis medidas no registro de força de contração isométrica no presente estudo. Fc: Força de contração; TPT: Tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: Tempo necessário para que ocorra 50 % do relaxamento (Modificado de ANELLI Jr, 2002).

2.3.2. Tratamento Estatístico dos Dados

Os seguintes tratamentos estatísticos foram adotados para a análise dos dados obtidos no presente estudo, os quais foram analisados com o auxílio do GraphPad Instat (versão 3.0):

- Análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para verificar a existência de possíveis variações estatisticamente significativas entre os valores de um mesmo protocolo experimental. Nível de significância: $p < 0,05$.
- Teste de Mann-Whitney, para verificar a ocorrência de possíveis diferenças estatísticas significativas entre pontos correspondentes de diferentes protocolos experimentais. Nível de significância: $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Freqüência Cardíaca *In Vivo*

O valor médio da freqüência cardíaca *in vivo* (f_H – bpm) de jeju, *H. unitaeniatus*, (n = 10; Wt = 179,3 ± 12,8g) foi de 29,3 ± 0,31 bpm.

3.2. Efeito do Tempo de Exposição

A tabela 1 apresenta os valores médios da força de contração (F_c – mN/mm²) e dos tempos para o pico de força (TPT – ms) e para 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de *H. unitaeniatus* (n = 10) estimuladas eletricamente em condições controle (0,2 Hz, 25 °C e 1,25 mM Ca²⁺) para verificação do efeito do tempo experimental (40 minutos) sobre tais parâmetros. Tanto os valores de TPT e THR quanto os valores de F_c foram normalizados (% dos valores iniciais) e são apresentados graficamente na figura 8.

Não houve deterioração da força de contração ($p > 0,05$) ao longo de todo o período experimental. Da mesma forma, o TPT e o THR não sofreram alterações significativas após os 40 minutos de estimulação ininterrupta.

TABELA 1 - Valores da força de contração (F_c – mN/mm^2), tempo para o pico de força (TPT – ms) e tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus*, ($n = 10$) na temperatura de 25°C durante um período de 40 min. Valores médios ± 1 E.P.M.

Tempo (min)	F_c (mN/mm^2)	TPT (ms)	THR (ms)
0	$36,09 \pm 1,67$	$490,00 \pm 25,07$	$180,00 \pm 16,66$
10	$34,71 \pm 1,09$	-	-
20	$35,94 \pm 1,23$	-	-
30	$37,43 \pm 1,48$	-	-
40	$38,96 \pm 1,56$	$511,43 \pm 39,73$	$186,86 \pm 20,13$

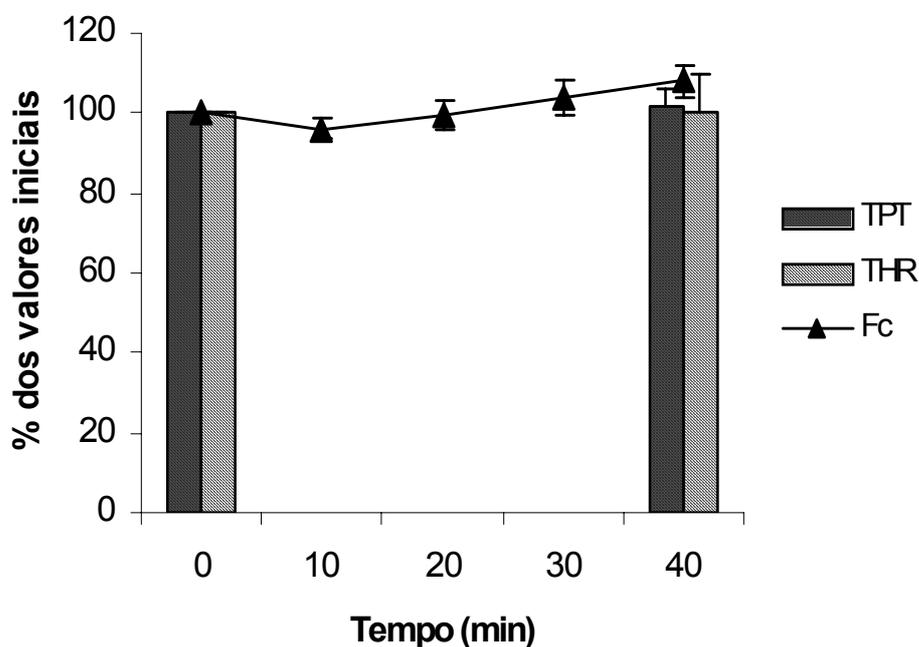


FIGURA 8 - Efeito do tempo de exposição (40 min) sobre a força de contração (F_c - % dos valores iniciais) e sobre os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* ($n = 10$) na temperatura de 25°C . As barras verticais representam os valores médios de TPT e THR ± 1 E.P.M, enquanto os triângulos representam os valores médios de $F_c \pm 1$ E.P.M.

3.3. Efeito do Aumento da Concentração de Cálcio Extracelular

Os valores médios da força de contração (Fc - % dos valores iniciais), do tempo para o pico máximo de tensão (TPT - % dos valores iniciais) e para 50% do relaxamento (THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* quando submetidas a incrementos sucessivos na concentração de Ca^{2+} são apresentados na tabela 2 e representados graficamente na figura 9.

A análise dos resultados revela aumento significativo ($p < 0,05$) da Fc em relação aos valores iniciais (1,25 mM) já a partir da concentração de Ca^{2+} de 5,25 mM, quando a Fc elevou-se em aproximadamente 65%. Os maiores valores de Fc foram observados na concentração máxima de Ca^{2+} utilizada (9,25 mM), na qual observou-se um incremento do inotropismo de praticamente 90%. Contudo, tanto o TPT quanto o THR se mantiveram inalterados durante as elevações nos níveis de Ca^{2+} extracelular, não sendo observadas variações significativas destes parâmetros ($p > 0,05$) ao longo de todo o período experimental.

TABELA 2 - Valores da força de contração (Fc - % dos valores iniciais), tempo para o pico de força (TPT - % dos valores iniciais) e tempo para 50% do relaxamento (THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10), durante aumentos na concentração de cálcio extracelular ($[Ca^{2+}]_e$ - mM). Valores médios \pm 1 E.P.M. Os asteriscos ao lado das médias indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre o respectivo valor e aquele inicialmente observado ($[Ca^{2+}]_e = 1,25$ mM) para um mesmo parâmetro.

$[Ca^{2+}]_e$ (mM)	Fc (%)	TPT (%)	THR (%)
1,25	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
3,25	135,9 \pm 11,2	97,8 \pm 3,7	114,9 \pm 13,8
5,25	164,8 \pm 15,9*	95,4 \pm 4,0	108,5 \pm 12,6
7,25	178,3 \pm 16,5*	92,0 \pm 4,3	107,4 \pm 14,7
9,25	189,3 \pm 19,8*	94,8 \pm 4,8	113,0 \pm 17,3

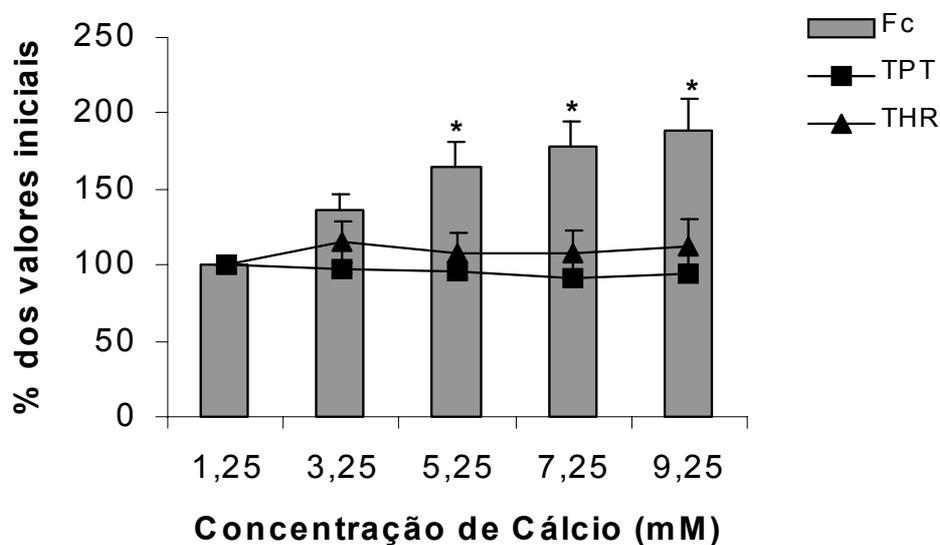


FIGURA 9 - Efeito dos aumentos na concentração de cálcio extracelular ($[Ca^{2+}]_e$ - mM) sobre a força de contração (Fc - % dos valores iniciais), o tempo para o pico de força (TPT - % dos valores iniciais) e o tempo para 50% do relaxamento (THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10). As barras verticais representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de TPT e THR \pm 1 E.P.M.

3.4. Efeito da Rianodina em Steady-State (0,2 Hz)

A tabela 3 e a figura 10 apresentam os valores médios da força de contração (F_c – % do controle), tempo para o pico de força (TPT – % do controle) e tempo para 50% do relaxamento (THR – % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 12) a 25 °C, anteriormente (CTRL) e 40 min após a adição ao banho de 10 μ M de rianodina (RYAN), quando estimuladas a uma frequência constante de 0,2 Hz (Steady-State).

A análise dos dados obtidos revela um decréscimo de cerca de 20% na força de contração (F_c) desenvolvida pelas tiras ventriculares de jeju 40 min após a adição de rianodina, enquanto os parâmetros tempo-dependentes permaneceram inalterados ($p > 0,05$).

TABELA 3 - Valores da força de contração (Fc – % do controle), tempo para o pico de força (TPT - % do controle) e tempo para 50% do relaxamento (THR – % do controle) desenvolvidos pelas tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus*, (n = 12) antes (controle) e 40 min após a adição de 10 μ M de rianodina à frequência de estimulação de 0,2 Hz e na temperatura de 25 °C. Valores médios \pm 1 E.P.M.

	Fc (%)	TPT (%)	THR (%)
Controle	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
Rianodina	78,53 \pm 6,76	95,02 \pm 4,09	100,59 \pm 5,28

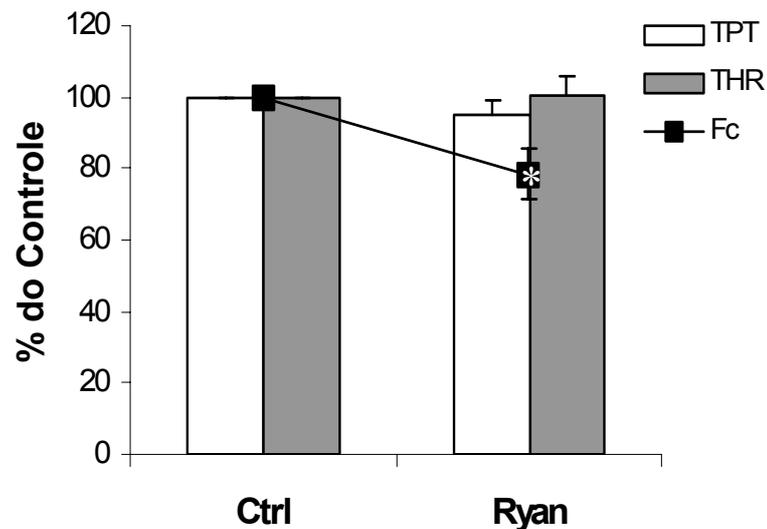


FIGURA 10 - Valores normalizados (% do controle) da força de contração (Fc), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 12) antes (controle; Ctrl) e 40 min após a adição de 10 μ M de rianodina (Ryan). As barras verticais representam os valores médios de TPT e THR + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de Fc \pm 1 E.P.M. O asterisco sobre o retângulo denota uma diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à Fc inicialmente observada.

3.5. Efeito da Adrenalina em Steady-State (0,2 Hz)

A tabela 4, e a figura 11, onde estão apresentados os valores médios da força de contração (F_c – % do controle) e dos tempos para o pico de tensão (TPT - % do controle) e para 50% do relaxamento (THR – % do controle), ilustram o efeito da adição de concentrações crescentes de adrenalina sobre a força de contração (F_c) e sobre os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus*, estimuladas a uma frequência constante de 0,2 Hz (Steady-state) após tratamento prévio com rianodina (10 μ M).

A análise dos resultados apresentados na tabela 4 revela que ao atingir-se uma dose tônica de adrenalina (10^{-9} M - baixa adrenalina - BA), observou-se um inotropismo positivo. Além disso, enquanto a F_c de jeju aumentou cerca de 20%, os valores de TPT reduziram-se em torno de 2% (não significativo; $p > 0,05$), o que também resultou em uma diferença significativa ($p < 0,05$) na variação proporcional entre estes 2 parâmetros para a espécie neste tratamento (figura 11), enquanto o THR também permaneceu inalterado ($p > 0,05$).

Contudo, considerando-se os resultados obtidos após atingir-se uma dose aguda de adrenalina (10^{-6} M - alta adrenalina - AA) foi observado um acentuado inotropismo positivo ($p < 0,05$), onde a F_c aumentou cerca de 225% em relação aos valores registrados para o controle ($100,0 \pm 0,0\%$). Isso foi acompanhado por um prolongamento do tempo para que o pico de tensão fosse atingido (TPT) pelas tiras ventriculares de jeju (tabela 4, figura 11), aumentando cerca de 25% se comparados ao controle ($100,0 \pm 0,0\%$). Tais incrementos na F_c e TPT desta espécie foram significativos ($p < 0,05$) tanto em relação ao controle quanto quando comparados aos valores obtidos ao utilizar-se uma dose tônica de adrenalina.

Para essa concentração de adrenalina (10^{-6} M), o THR também permaneceu inalterado ($p > 0,05$).

TABELA 4 - Valores da força de contração (Fc - % do controle), tempo para o pico de força (TPT - % do controle) e tempo para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares jeju, *H. unitaeniatus* (n = 12) em resposta à adição de adrenalina (M) em um meio já contendo 10 μ M de rianodina. Valores médios \pm 1 E.P.M. Ctrl - controle (meio sem adição de adrenalina, mas com 10 μ M de rianodina). a: diferente ($p < 0,05$) do controle; b: diferente ($p < 0,05$) de 10⁻⁹ M de adrenalina.

		Ctrl (%)	10 ⁻⁹ M (%)	10 ⁻⁶ M (%)
Jeju	Fc	100,0 \pm 0,0	117,67 \pm 7,47 ^a	325,19 \pm 7,62 ^{a, b}
	TPT	100,0 \pm 0,0	98,13 \pm 2,80	124,63 \pm 6,02 ^{a, b}
	THR	100,0 \pm 0,0	104,20 \pm 3,83	115,49 \pm 5,77

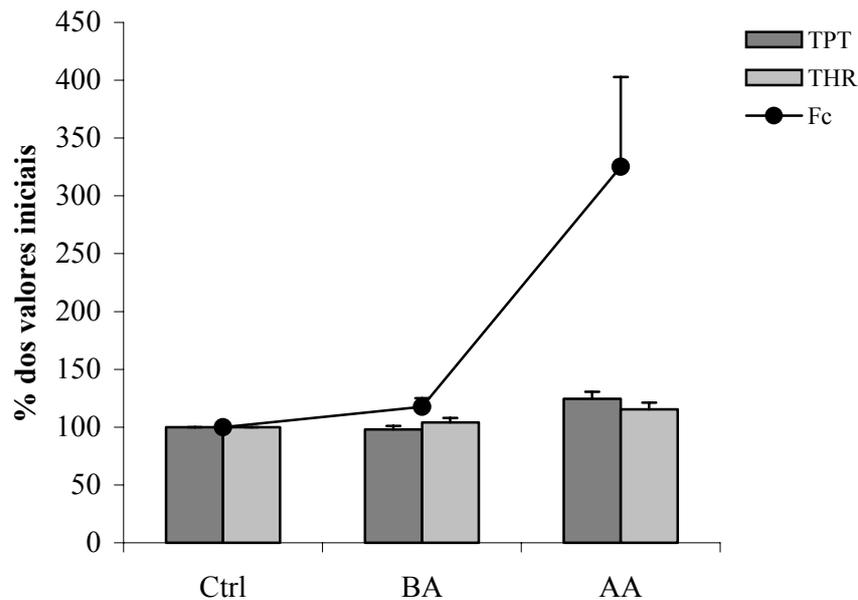


FIGURA 11 - Valores normalizados (% controle: sem adrenalina, mas com 10 μ M de rianodina) da força de contração (Fc), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus*, após a adição de 10⁻⁹ M de adrenalina (BA) ou de 10⁻⁶ M de adrenalina (AA). As barras verticais representam os valores médios de TPT e THR + 1 E.P.M., enquanto os pontos representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M.

3.6. Tensão Pós-pausa

Os valores médios da força de contração (Fc - % antes da pausa) desenvolvida a 25 °C pelas tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus*, após uma pausa diastólica de 5 minutos na ausência (CTRL) e presença de 10 µM de rianodina (RIAN), são apresentados na tabela 5 como uma porcentagem da última contração antes da pausa. Tais valores são apresentados graficamente na figura 12.

Houve uma potenciação pós-pausa da Fc nas preparações controle (168,3 ± 11,4 %), que foi abolida após a utilização de rianodina (108,6 ± 4,7 %).

O tempo para o pico máximo de tensão (TPT - % antes da pausa) e o tempo para 50% de relaxamento (THR - % antes da pausa) não sofreram alterações ($p > 0,05$) em seus valores após a pausa diastólica, tanto na ausência quanto na presença de rianodina (tabela 5, figura 12).

TABELA 5 - Tensão pós-reposo (PR), tempo para o pico de força (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) desenvolvidos pelas tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 12) na primeira contração após 5 min de repouso (% antes do repouso) em preparações controle e em presença de 10 μ M de rianodina. Valores médios \pm 1 E.P.M. O asterisco ao lado da média tratada com rianodina indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre aquele parâmetro e seu controle (sem rianodina).

	Controle (%)	Rianodina (%)
PR	168,3 \pm 11,4	108,6 \pm 4,7*
TPT	116,0 \pm 3,8	116,6 \pm 4,1
THR	113,1 \pm 5,3	127,6 \pm 9,1

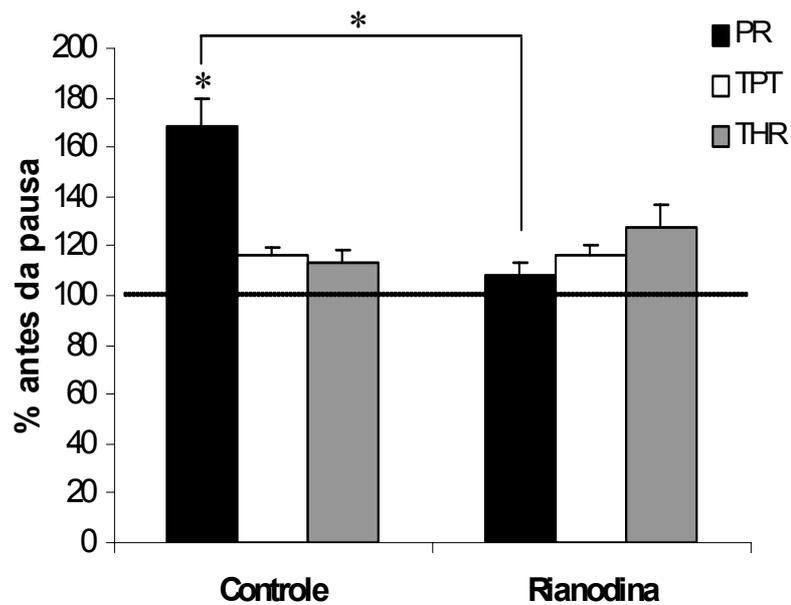


FIGURA 12 - Efeito de uma pausa diastólica de 5 min sobre a tensão pós-reposo (PR), os tempos para o pico de tensão (TPT) e para 50% do relaxamento (THR) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus*, em preparações controle (n = 12) e tratadas com 10 μ M de rianodina (n = 10), representados como uma porcentagem dos valores observados na última contração antes da pausa (% antes da pausa). As barras representam valores médios + 1 E.P.M. O asterisco acima da barra vertical indica alteração ($p < 0,05$) em relação ao valor precedente à pausa, enquanto o asterisco acima da linha horizontal denota uma diferença ($p < 0,05$) entre controle e rianodina.

3.7. Efeito do aumento da frequência de estimulação

3.7.1. Controle

A tabela 6 apresenta os valores médios da força de contração (Fc - % dos valores iniciais), do tempo para o pico de tensão (TPT - % dos valores iniciais) e do tempo para 50% de relaxamento (THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de *H. unitaeniatus* (n = 10) submetidas a incrementos na frequência de estimulação (Hz).

Com o aumento na frequência de estimulação, houve uma redução significativa da Fc (figura 13) já a partir da frequência de estimulação de 0,4 Hz, quando a Fc reduziu-se em praticamente 15% (tabela 6), atingindo valores mínimos de $26,8 \pm 2,2\%$ dos valores iniciais a 1,6 Hz, frequência máxima registrada para este tratamento, quando a Fc reduziu-se em quase 75%.

O TPT (figura 13) sofreu redução significativa a partir da frequência de estimulação de 0,4 Hz de aproximadamente 15% (tabela 6), atingindo valores mínimos de $52,7 \pm 2,3\%$ dos valores iniciais a 1,6 Hz, frequência máxima registrada para este tratamento, quando o TPT reduziu-se em aproximadamente 47%.

Da mesma forma, o THR (figura 13) sofreu redução significativa a partir da frequência de estimulação de 0,6 Hz de aproximadamente 15% (tabela 6), atingindo valores mínimos de $57,9 \pm 7,4\%$ dos valores iniciais a 1,6 Hz, frequência máxima registrada para este tratamento, quando o THR reduziu-se em aproximadamente 42%.

TABELA 6 - Valores da força de contração (Fc – % dos valores iniciais) e dos tempos para atingir o pico de tensão (TPT - % dos valores iniciais) e para que 50% do relaxamento fosse completado (THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10)) em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (f_{EST} - bpm) nas preparações Controle (sem adição de rianodina ou adrenalina). Valores médios \pm 1 E.P.M. Os asteriscos ao lado dos valores indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores inicialmente (0,2 Hz) registrados para aquele parâmetro.

F_{Estim} (Hz)	Controle		
	Fc (%)	TPT (%)	THR (%)
0,2	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
0,4	84,3 \pm 2,1*	84,9 \pm 2,5*	93,6 \pm 1,1
0,6	69,7 \pm 3,1*	79,7 \pm 3,2*	85,4 \pm 2,0*
0,8	59,1 \pm 3,5*	69,5 \pm 3,4*	81,3 \pm 2,3*
1,0	48,1 \pm 3,7*	64,3 \pm 2,2*	78,8 \pm 3,3*
1,2	41,1 \pm 3,4*	59,8 \pm 2,8*	76,0 \pm 4,2*
1,4	31,0 \pm 3,1*	57,0 \pm 2,2*	69,4 \pm 3,0*
1,6	26,8 \pm 2,2*	52,7 \pm 2,3*	57,9 \pm 7,4*

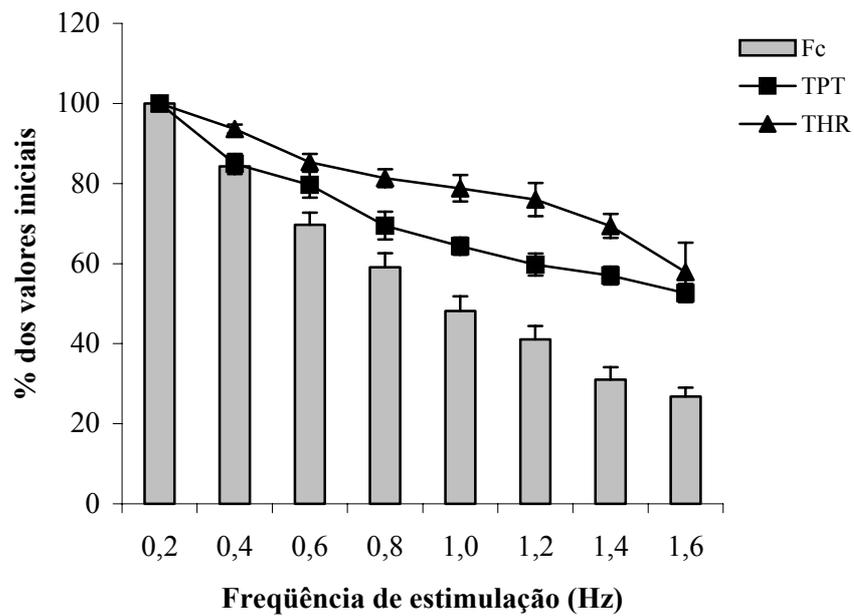


FIGURA 13 - Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre os valores da força de contração (Fc - % dos valores iniciais), dos tempos para o pico de tensão (TPT - % dos valores iniciais) e para 50% do relaxamento (THR - % dos valores iniciais) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10) em preparações Controle (sem adição de rianodina ou adrenalina). As barras verticais representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de TPT e THR ± 1 E.P.M.

3.7.2. Rianodina

A tabela 7 apresenta os valores médios da força de contração (Fc - % do controle), do tempo para o pico de tensão (TPT - % do controle) e do tempo para 50% de relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10), tratadas com 10 μ M de rianodina quando submetidas a incrementos na frequência de estimulação (Hz).

Com o aumento na frequência de estimulação, houve uma redução significativa da Fc (figura 14) somente a partir da última frequência de estimulação atingida (1,2 Hz), quando a Fc reduziu-se aproximadamente 40% dos valores iniciais deste tratamento (RIAN - 0,2 Hz = $66,4 \pm 9,8\%$) (tabela 7), atingindo valores mínimos de $25,3 \pm 8,3\%$.

O TPT (figura 14) sofreu redução significativa a partir da frequência de estimulação de 0,6 Hz de aproximadamente 28% dos valores iniciais deste tratamento (RIAN - 0,2 Hz = $90,0 \pm 3,8\%$) (tabela 7), atingindo valores mínimos de $62,3 \pm 2,3\%$.

Em relação ao THR (figura 14) não foram observadas alterações significativas ($p < 0,05$) em seus valores durante todo o experimento.

TABELA 7 - Valores da força de contração (Fc - % do controle), tempo para o pico de força (TPT - % do controle) e tempo para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10), em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações tratadas com 10 μ M de rianodina. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os asteriscos ao lado dos valores indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores inicialmente (0,2 Hz) registrados para aquele parâmetro.

F_{Estim} (Hz)	Rianodina		
	Fc (%)	TPT (%)	THR (%)
0,2	66,4 \pm 9,8	90,0 \pm 3,8	95,5 \pm 9,0
0,4	55,2 \pm 9,8	78,1 \pm 3,4	91,3 \pm 9,3
0,6	46,9 \pm 9,7	70,6 \pm 2,9*	86,1 \pm 7,7
0,8	39,8 \pm 9,0	65,3 \pm 3,4*	80,6 \pm 7,4
1,0	31,5 \pm 8,4	63,9 \pm 2,3*	83,0 \pm 8,0
1,2	25,3 \pm 8,3*	62,3 \pm 2,3*	81,2 \pm 7,2

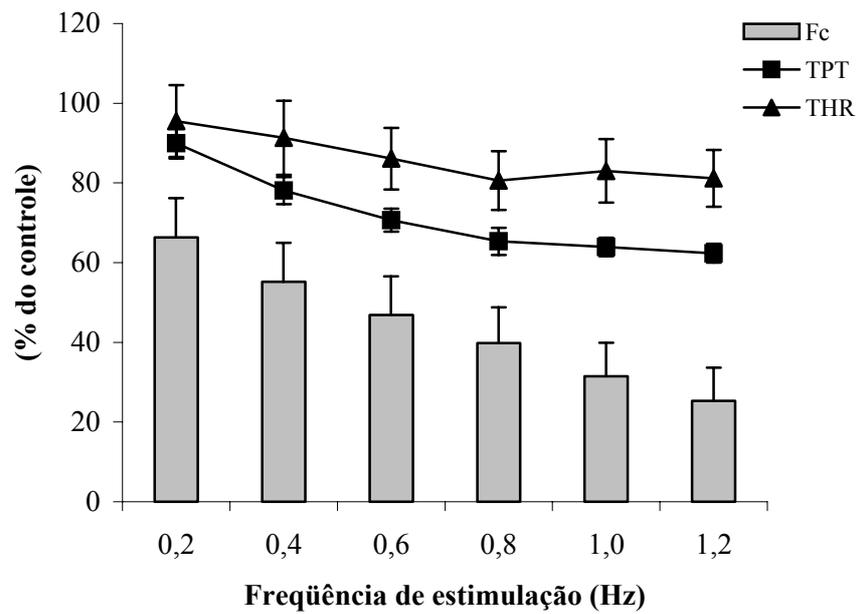


FIGURA 14 - Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre os valores da força de contração (Fc - % do controle), os tempos para o pico de tensão (TPT - % do controle) e para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10) em preparações tratadas com 10µM de rianodina. As barras verticais representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de TPT e THR ± 1 E.P.M.

3.7.3. Baixa Adrenalina + Rianodina

A tabela 8 apresenta os valores médios da força de contração (Fc - % do controle), do tempo para o pico de tensão (TPT - % do controle) e do tempo para 50% de relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10) sujeitas a incrementos na frequência de estimulação (Hz) quando tratadas com 10^{-9} M de adrenalina + $10\mu\text{M}$ de rianodina.

Após a adição de uma baixa concentração de adrenalina (10^{-9} M – BA + RIAN), o aumento na frequência de estimulação causou uma redução significativa da Fc (figura 15) a partir da frequência de estimulação de 0,6 Hz, quando a Fc reduziu-se aproximadamente 20% dos valores iniciais deste tratamento (BA + RIAN - 0,2 Hz = $57,8 \pm 4,6\%$) (tabela 8), atingindo valores mínimos de $19,2 \pm 3,2\%$ a 1,2 Hz.

O TPT (figura 15) sofreu redução significativa a partir da frequência de estimulação de 0,6 Hz de aproximadamente 15% dos valores iniciais deste tratamento (BA + RIAN - 0,2 Hz = $83,6 \pm 2,9\%$) (tabela 8), atingindo valores mínimos de $52,7 \pm 3,4\%$ a 1,2 Hz.

Em relação ao THR (figura 15) não foram observadas alterações significativas ($p < 0,05$) em seus valores durante todo o experimento.

TABELA 8 - Valores da força de contração (Fc - % do controle), tempo para o pico de força (TPT - % do controle) e tempo para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10), em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações tratadas com 10^{-9} M de adrenalina + 10 μ M de rianodina. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os asteriscos ao lado dos valores indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores inicialmente (0,2 Hz) registrados para aquele parâmetro.

F_{Estim} (Hz)	Baixa Adrenalina + Rianodina		
	Fc (%)	TPT (%)	THR (%)
0,2	57,8 \pm 4,6	83,6 \pm 2,9	86,9 \pm 7,4
0,4	47,5 \pm 3,4	72,8 \pm 2,0	84,4 \pm 4,4
0,6	37,9 \pm 3,3*	68,5 \pm 2,8*	81,5 \pm 5,2
0,8	31,0 \pm 3,5*	64,0 \pm 2,2*	79,3 \pm 5,5
1,0	24,5 \pm 3,4*	60,3 \pm 2,2*	78,2 \pm 5,2
1,2	19,2 \pm 3,2*	52,7 \pm 3,4*	73,6 \pm 5,8

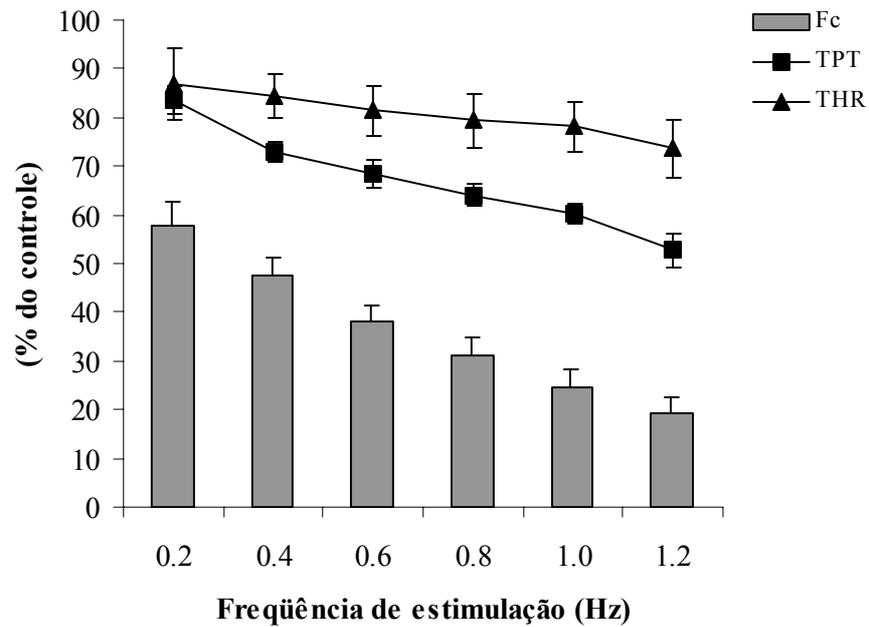


FIGURA 15 - Efeito do aumento da frequência de estimulação (Hz) sobre os valores da força de contração (Fc - % do controle), os tempos para o pico de tensão (TPT - % do controle) e para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju (n = 10) em preparações tratadas com 10^{-9} M de adrenalina + $10\mu\text{M}$ de rianodina. As barras verticais representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de TPT e THR \pm 1 E.P.M.

3.7.4. Alta Adrenalina + Rianodina

A tabela 9 apresenta os valores médios da força de contração (Fc - % do controle), do tempo para o pico de tensão (TPT - % do controle) e do tempo para 50% de relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10) sujeitas a incrementos na frequência de estimulação (Hz) e tratadas com 10^{-6} M de adrenalina + $10\mu\text{M}$ de rianodina.

Após a adição de uma alta concentração de adrenalina (10^{-6} M – AA + RIAN), o aumento na frequência de estimulação causou uma redução significativa da Fc (figura 16) a partir da frequência de estimulação de 1,0 Hz, quando a Fc reduziu-se aproximadamente 66% dos valores iniciais deste tratamento (AA + RIAN - 0,2 Hz = $177,0 \pm 15,4\%$) (tabela 9), atingindo valores mínimos de $63,9 \pm 9,6\%$ a 1,4 Hz.

O TPT (figura 16) sofreu redução significativa a partir da frequência de estimulação de 0,6 Hz de aproximadamente 19% dos valores iniciais deste tratamento (BA + RIAN - 0,2 Hz = $177,0 \pm 15,4\%$) (tabela 9), atingindo valores mínimos de $51,7 \pm 3,3\%$ a 1,4 Hz.

Em relação ao THR (figura 16) não foram observadas alterações significativas ($p < 0,05$) em seus valores durante todo o experimento.

TABELA 9 - Valores da força de contração (Fc - % do controle), tempo para o pico de força (TPT - % do controle) e tempo para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10), em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações tratadas com 10^{-6} M de adrenalina + 10 μ M de rianodina. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os asteriscos ao lado dos valores indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores inicialmente (0,2 Hz) registrados para aquele parâmetro.

F_{Estim} (Hz)	Alta Adrenalina + Rianodina		
	Fc (%)	TPT (%)	THR (%)
0,2	177,0 \pm 15,4	99,9 \pm 4,2	94,5 \pm 9,2
0,4	159,0 \pm 12,9	88,6 \pm 3,6	92,0 \pm 11,1
0,6	144,4 \pm 9,6	81,2 \pm 3,0*	89,6 \pm 8,9
0,8	126,9 \pm 7,3	71,3 \pm 3,8*	82,8 \pm 7,1
1,0	111,3 \pm 6,1*	65,1 \pm 3,8*	76,8 \pm 6,6
1,2	85,6 \pm 4,4*	61,8 \pm 2,0*	72,5 \pm 10,1
1,4	63,9 \pm 9,6*	51,7 \pm 3,3*	69,9 \pm 8,7

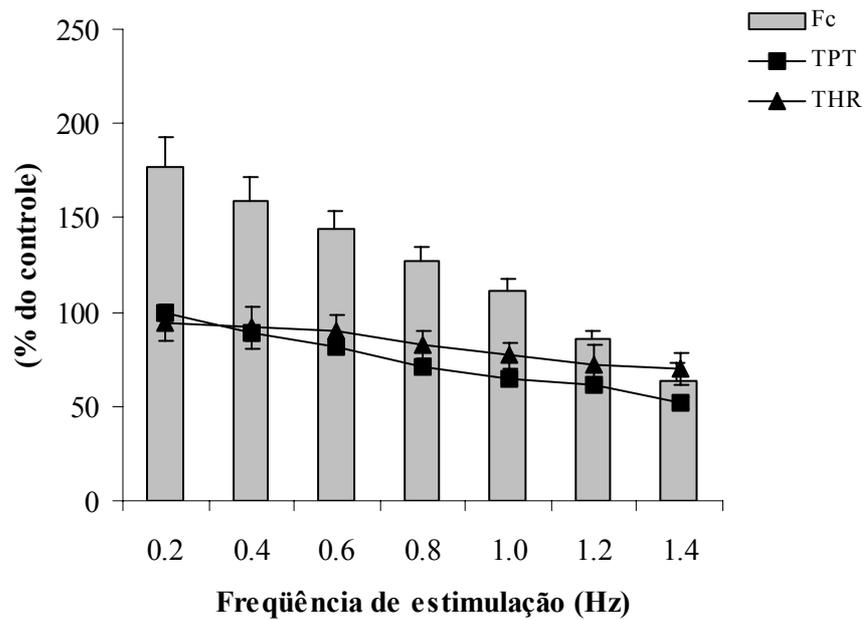


FIGURA 16 - Efeito do aumento da frequência de estimulação (bpm) sobre os valores da força de contração (Fc - % do controle), os tempos para o pico de tensão (TPT - % do controle) e para 50% do relaxamento (THR - % do controle) das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10) em preparações tratadas com 10^{-6} M de adrenalina + 10μ M de rianodina. As barras verticais representam os valores médios de Fc + 1 E.P.M, enquanto os pontos representam os valores médios de TPT e THR \pm 1 E.P.M.

3.8. Frequências *In Vivo* e *In Vitro*

Na figura 17 pode ser observado um diagrama comparativo ilustrando o efeito dos diferentes tratamentos (CTRL, RIAN, BA + RIAN e AA + RIAN) sobre a frequência de estimulação máxima na qual pelo menos 70% das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10) foram capazes de se contrair regularmente, bem como a frequência cardíaca média observada *In Vivo*.

Pela análise da figura fica evidente que a frequência cardíaca *in vivo* foi inferior às frequências de estimulação máximas observadas *in vitro*, independentemente do tratamento. Contudo, dentre os tratamentos, a maior frequência de estimulação máxima foi aquela observada para as preparações controle (96 bpm). Enquanto no tratamento com rianodina (72 bpm), a frequência de estimulação máxima suportada pelas tiras ventriculares de jeju foi igual àquela apresentada pelo tratamento BA + RIAN (72 bpm), estas frequências foram inferiores àquelas observadas para os demais tratamentos (CTRL – 96 bpm e AA + RIAN - 84 bpm).

TABELA 10 - Valores médios da frequência cardíaca (f_H) observada *in vivo* (*In Vivo*) e frequência de estimulação máxima (bpm) na qual 70% das tiras ventriculares foram capazes de se contrair regularmente nas preparações controle (CTRL) e naquelas tratadas com rianodina (RIAN), baixa adrenalina (BA + RIAN) ou alta adrenalina (AA + RIAN) para jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10).

Tratamento	f_H (bpm)
<i>In Vivo</i>	29,3
CTRL	96,0
RIAN	72,0
BA + RIAN	72,0
AA + RIAN	84,0

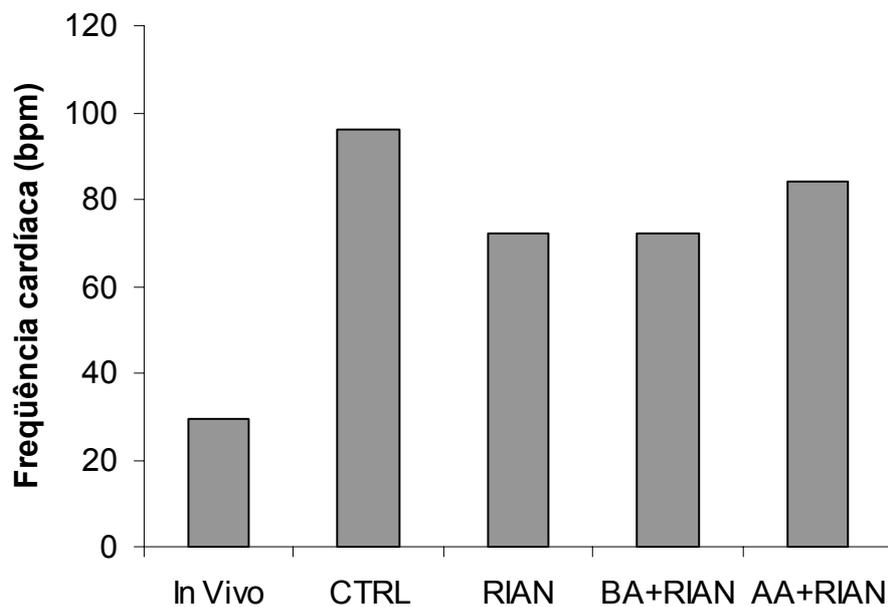


FIGURA 17 - Diagrama comparativo entre os valores médios da frequência cardíaca observada *in vivo* (*In Vivo*) com a frequência de estimulação máxima (bpm) na qual 70% das tiras ventriculares foram capazes de se contrair regularmente nas preparações controle (CTRL) e naquelas tratadas com rianodina (RIAN), baixa adrenalina (BA + RIAN), ou alta adrenalina (AA + RIAN) para jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10).

3.9. Comparação entre os Diferentes Tratamentos

A figura 18 apresenta um diagrama comparativo entre os valores médios da Fc (%) obtidos para as tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10) quando submetidas a incrementos sucessivos na frequência de estimulação em preparações CTRL (sem adição de rianodina ou adrenalina; tabela 6), RIAN (10 μ M de rianodina; tabela 7), BA + RIAN (10⁻⁹ M de Adrenalina + 10 μ M de Rianodina +; tabela 8) e AA + RIAN (10⁻⁶ M de Adrenalina + 10 μ M de Rianodina; tabela 9). Nas figuras 19 e 20 podem ser encontradas as representações gráficas dos valores médios de TPT (%) e THR (%), respectivamente, entre cada um desses tratamentos. A comparação estatística entre os diferentes tratamentos pode ser verificada na tabela 11, que especifica qual dos parâmetros sofreu alterações significativas (p < 0,05) a cada frequência de estimulação. Para todos os tratamentos, as tiras ventriculares de jeju apresentaram uma relação força-frequência negativa, acompanhada por decréscimos progressivos do TPT. O THR apresentou redução progressiva somente nas preparações controle.

A curva força-frequência de jeju foi desviada para a esquerda (de 96 para 72 bpm) após o tratamento com rianodina, sendo que na faixa de frequência registrada *in vivo* para a espécie (29,3 \pm 0,3 bpm; seta na figura 18), a Fc *in vitro* correspondeu a cerca de 75% dos valores iniciais nas preparações CTRL, reduzindo-se para praticamente 50% no tratamento com rianodina (RIAN). Apesar disso, as tiras ventriculares de jeju foram capazes de manter a contratilidade até a faixa de frequência registrada *in vivo* após o tratamento com rianodina.

A adição de uma dose tônica de adrenalina (10⁻⁹ M) aos banhos já contendo rianodina (BA + RIAN) não melhorou o efeito inotrópico negativo deste alcalóide, não permitindo que as tiras ventriculares recuperassem a Fc registrada para a faixa *in vivo* de frequência, e não permitindo também que as mesmas voltassem a atingir a frequência máxima observada para o controle (96 bpm).

Quando a concentração de adrenalina foi elevada para uma dose aguda (10⁻⁶ M - AA + RIAN), a Fc não apenas elevou-se significativamente (p < 0,05) com relação aos valores observados para as preparações RIAN ou BA + RIAN para todas as frequências registradas, mas também com relação às preparações CTRL, atingindo, na faixa correspondente à f_H *in vivo*, valores próximos a 150% dos valores iniciais. Contudo, a frequência de estimulação máxima registrada para as preparações controle (96 bpm) não foi recuperada.

Os valores de TPT tenderam a não diferirem entre si ao comparar-se diferentes protocolos experimentais, considerando-se a mesma frequência de estimulação, exceto a menores frequências, quando BA + RIAN foi menor do que CTRL (0,2 a 0,4 Hz), e BA + RIAN foi menor que AA+RIAN (0,2 a 0,6 Hz).

Adicionalmente, em nenhum dos tratamentos (CTRL, RIAN, BA + RIAN e AA + RIAN) foram observadas variações significativas do THR ao considerar-se a mesma frequência de estimulação, que podem ser explicadas pela ausência de variação frequência-dependente deste parâmetro em todos os tratamentos.

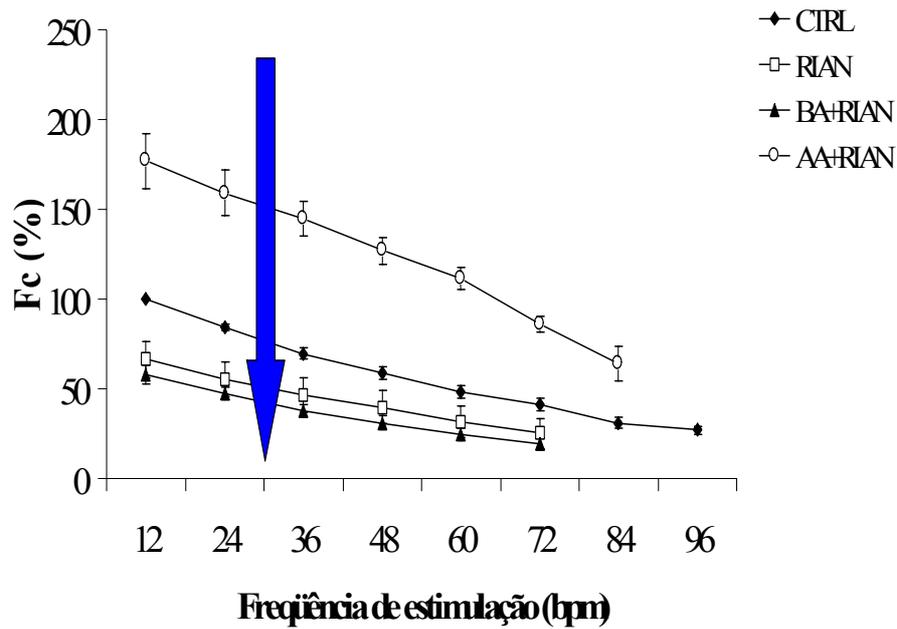


FIGURA 18 - Diagrama comparativo entre o efeito dos tratamentos CTRL (sem adição de rianodina ou adrenalina), RIAN (10 μ M de rianodina), BA + RIAN (10⁻⁹ M de adrenalina + 10 μ M de rianodina) e AA + RIAN (10⁻⁶ M de adrenalina + 10 μ M de rianodina) sobre a força de contração (Fc - %) durante incrementos da freqüência de estimulação imposta sobre as tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10). Os pontos representam os valores médios \pm 1 E.P.M.. Comparação estatística na tabela 11. A seta indica a faixa de freqüência cardíaca registra *in vivo* para a espécie (valor médio).

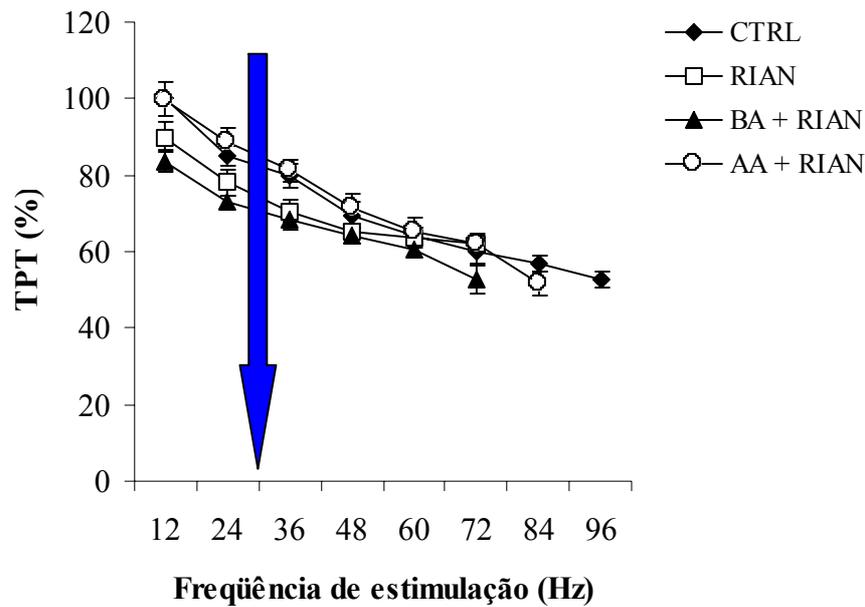


FIGURA 19 - Diagrama comparativo entre o efeito dos tratamentos CTRL (sem adição de rianodina ou adrenalina), RIAN (10^{-6} μ M de rianodina), BA + RIAN (10^{-9} M de adrenalina + 10 μ M de rianodina) e AA + RIAN (10^{-6} M de adrenalina + 10 μ M de rianodina) sobre o tempo para atingir o pico de tensão (TPT - %) durante incrementos da frequência de estimulação imposta sobre as tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10). Os pontos representam os valores médios \pm 1 E.P.M. Comparação estatística na tabela 11. A seta indica a faixa de frequência cardíaca registra *in vivo* para a espécie (valor médio).

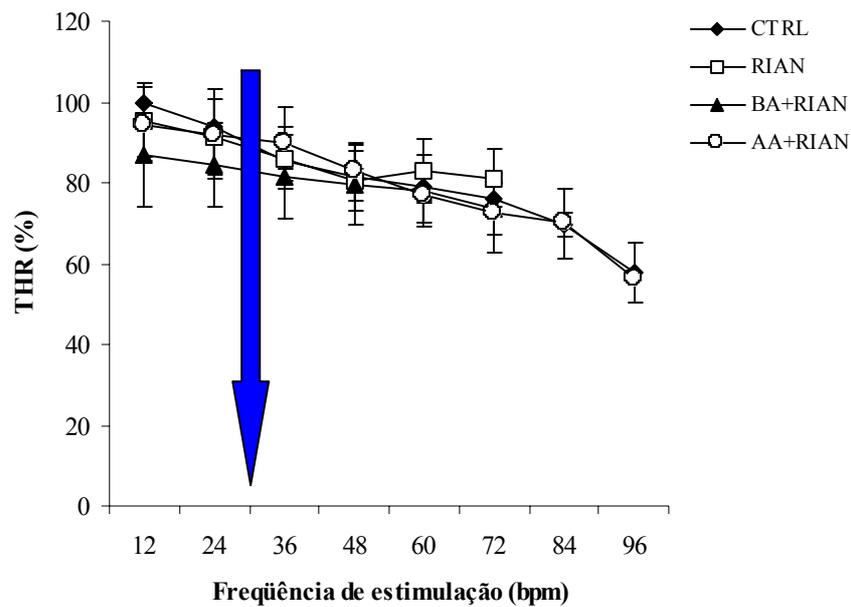


FIGURA 20 - Diagrama comparativo entre o efeito dos tratamentos CTRL (sem adição de rianodina ou adrenalina), RIAN (10^{-6} μ M de rianodina), BA + RIAN (10^{-9} M de adrenalina + 10 μ M de rianodina) e AA + RIAN (10^{-6} M de adrenalina + 10 μ M de rianodina) sobre o tempo para que 50% do relaxamento fosse completado (THR - %) durante incrementos da frequência de estimulação imposta sobre as tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus* (n = 10). Os pontos representam os valores médios \pm 1 E.P.M. Comparação estatística na tabela 11. A seta indica a faixa de frequência cardíaca registra *in vivo* para a espécie (valor médio).

TABELA 11 - Parâmetros (força de contração – Fc; tempo para o pico de tensão – TPT; tempo para 50% do relaxamento – THR) para os quais foi identificada uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos quando considerada a mesma frequência de estimulação para as tiras ventriculares de jeju ($n = 10$). Os valores médios dos parâmetros analisados estão apresentados nas tabelas 6, 7, 8 e 9. Ctrl \neq Rian: diferença ($p < 0,05$) entre controle (sem rianodina ou adrenalina) e rianodina ($10 \mu\text{M}$); Ctrl \neq BA+Rian: diferença ($p < 0,05$) entre controle e baixa adrenalina (10^{-9} M de adrenalina + $10 \mu\text{M}$ de rianodina), Ctrl \neq AA+Rian: diferença ($p < 0,05$) entre controle e alta adrenalina (10^{-6} M de adrenalina + $10 \mu\text{M}$ de rianodina); Rian \neq BA+Rian: diferença ($p < 0,05$) entre rianodina e baixa adrenalina; Rian \neq AA+Rian: diferença ($p < 0,05$) entre rianodina e alta adrenalina; BA+Rian \neq AA+Rian: diferença ($p < 0,05$) entre baixa e alta adrenalina; NS: diferença não significativa ($p > 0,05$) para nenhum tratamento.

F_{Estim} (Hz)	CTRL x RIAN	CTRL x BA+RIAN	CTRL x AA+RIAN	RIAN x BA+RIAN	RIAN X AA+RIAN	BA+RIAN X AA+RIAN
0,2	Fc	Fc, TPT	Fc	NS	Fc	Fc, TPT
0,4	Fc	Fc, TPT	Fc	NS	Fc	Fc, TPT
0,6	NS	Fc	Fc	NS	Fc	Fc, TPT
0,8	NS	Fc	Fc	NS	Fc	Fc
1,0	NS	Fc	Fc	NS	Fc	Fc
1,2	NS	Fc	Fc	NS	Fc	Fc
1,4	-	-	Fc	-	-	-
1,6	-	-	-	-	-	-

4. DISCUSSÃO

4.1. Experimento *in vivo*

4.1.1. Frequência cardíaca

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 na literatura algumas exceções para este padrão para peixes muito ativos como o atum, *Katsuwonus pelamis*, que apresenta f_H em repouso em torno de 120 bpm, podendo chegar até 200 bpm quando em exercício natatório (KEEN et al., 1992), como também o teleósteo marinho *Bathygobius soporator*, cuja f_H em repouso é de 140 e 225 bpm a 25 °C e 35 °C, respectivamente (RANTIN et al., 1998), o que permite compará-los a aves e pequenos mamíferos com relação a este parâmetro.

A f_H de *H. unitaeniatus* encontra-se dentro da faixa exibida pela maioria dos teleósteos, com valor médio de $29,3 \pm 0,31$ bpm, em concordância com o descrito por DRIEDZIC & GESSER (1994). Isso mostra que, pelo menos em repouso e a 25 °C, este peixe possui o mesmo padrão de regulação da frequência cardíaca exibido pela maioria dos teleósteos. Além disso, tais valores estão muito próximos aos obtidos por OLLE (2003) para a traíra, *Hoplias malabaricus*, e por RANTIN et al. (1993) para o trairão, *Hoplias lacerdae*, cujas frequências cardíacas (f_H) foram de $35,7 \pm 2,9$ bpm e $45,0 \pm 4,0$ bpm, respectivamente, ambas espécies também pertencentes à família Erythrinidae.

4.2. Experimentos *in vitro*

4.2.1. Efeito do Tempo de Exposição

A exposição de tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus*, por 40 minutos de estimulação contínua a 0,2 Hz em situação controle (concentração de cálcio fisiológica – 1,25 mM) não causou alteração na força de contração, tampouco nos parâmetros tempo-dependentes.

Tal experimento foi desenvolvido para testar se as alterações na Fc, TPT e THR durante o desenvolvimento dos diferentes protocolos experimentais poderiam ser resultado de uma deterioração tempo-dependente das preparações musculares. Os resultados aqui obtidos descartaram tal possibilidade.

4.2.2. Aumento da disponibilidade de cálcio extracelular

A variação da força de contração cardíaca (Fc) deve envolver um número variável de pontes cruzadas entre os filamentos finos de actina e os grossos de miosina, o qual irá requerer a ligação de quantidades variáveis de íons cálcio às proteínas contráteis, particularmente à troponina C (TnC). Alterações na Fc, portanto, podem ser observadas pela variação na quantidade de cálcio disponível no meio extracelular (CHAPMAN, 1983).

Segundo BAILEY & DRIEDZIC (1990), o aumento da Fc após incrementos do cálcio extracelular mimetiza a estimulação β -adrenérgica, aumentando também o fornecimento de cálcio aos miofilamentos, facilitando a performance cardíaca. Entretanto, o aumento da disponibilidade de cálcio extracelular parece aumentar o influxo deste íon através da sarcolema (SL) sem a atuação de quaisquer vias de transdução de sinal, diferentemente do que ocorre com estimulação adrenérgica (SHIELS & FARRELL, 1997).

A contração dos cardiomiócitos é iniciada pelo influxo de cálcio através da SL, o qual pode ligar-se diretamente aos miofilamentos e/ou pode provocar a liberação de uma quantidade ainda maior de cálcio do RS pela liberação de cálcio cálcio-induzida (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 os diferentes grupos taxonômicos. Estudos recentes indicam que os cardiomiócitos de atuns dependem mais do cálcio intracelular quando comparados a outros teleósteos (SHIELS et al., 1999), diferença provavelmente relacionada ao elevado grau de atividade da espécie, que impõe 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).

A contratilidade cardíaca da maioria dos peixes depende da concentração extracelular de cálcio, mostrando como são importantes para o acoplamento E-C os movimentos de cálcio transsarcolemais (TIBBITS et al, 1992b; DRIEDZIC & GESSER, 1994; VORNANEN, 1996b; COYNE et al., 2000). Assim, a elevação na Fc por meio dos aumentos da concentração extracelular de cálcio revela uma grande dependência do cálcio extracelular para a performance cardíaca e uma pequena importância das reservas intracelulares. No entanto, deve-se levar em consideração a liberação de cálcio-cálcio induzida por meio dos canais de cálcio do RS (canais de rianodina).

Em mamíferos, os canais de cálcio do tipo L da SL (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 cálcio através da SL 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.

Segundo BERS (2001) e EISNER et. al. (1998), uma intervenção que aumente a concentração de cálcio intracelular como, por exemplo, o aumento no cálcio extracelular, pode aumentar a Fc, mas não há como se definir o quanto esse efeito é devido apenas ao aumento do cálcio intracelular por si só, por um aumento na fração do cálcio liberada pelo RS (induzida por essa entrada de cálcio) ou mesmo pelo aumento na retomada de cálcio pelo RS devido a maior disponibilidade desse íon para a Ca^{2+} -ATPase (SERCA).

Além disso, de acordo com VORNANEN (1997), a entrada de cálcio na célula pelos canais L da SL também atua na manutenção do platô do potencial de ação cardíaco, proporcionando o influxo transarcolemal de cálcio por outros canais voltagem-dependentes e pelo o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) quando trabalhando em modo reverso.

A importância do cálcio extracelular para a contração cardíaca de jeju, *H. unitaeniatus*, foi evidenciada pela adição de concentrações crescentes de cálcio ao meio extracelular, chegando a um aumento de 90% na Fc em relação aos valores iniciais (efeito inotrópico positivo). Tal resultado sugere uma elevada dependência do cálcio extracelular para a contração cardíaca de *H. unitaeniatus*, embora um aumento da liberação de cálcio Ca^{2+} -induzida pelo RS não possa ser descartada.

Estudos realizados com diferentes espécies de teleósteos, dentre elas *Bathygobius soporator* (RANTIN et al., 1998), *Katsuwonus pelamis* (KEEN et al., 1992), *Onchorhynchus mykiss* (COYNE et al., 2000), *Oreochromis niloticus* (COSTA et al., 2000) *Anguilla rostrata* (BAILEY et al., 2000), *Piaractus mesopotamicus* (ANELLI Jr. et al., 2004), *Prochilodus lineatus* e *Hoplias malabaricus* (RIVAROLI, 2002) mostraram aumentos significativos da força isométrica máxima das tiras ventriculares após elevações dos níveis extracelulares de cálcio de 1 para 7 ou 9 mM. Por outro lado, o miocárdio de *Synbranchus marmoratus* (ROCHA, 2004) parece ser insensível a incrementos de cálcio no meio extracelular, sugerindo a existência de um RS bem desenvolvido e funcional nesta espécie.

No presente trabalho, o TPT não foi alterado significativamente pelos incrementos nas concentrações extracelulares de cálcio, o que indica que o aumento da oferta de cálcio extracelular não alterou o tempo para a ativação contrátil. O relaxamento também não foi afetado, visto que o THR não varia significativamente, o qual indica eficientes mecanismos também para a extrusão de cálcio. Tais respostas sugerem que os mecanismos de transporte de cálcio responsáveis pela contração e pelo relaxamento cardíaco não são passos limitantes na contratilidade cardíaca desse peixe, quando em presença de elevadas concentrações extracelulares de cálcio.

4.2.3. Tensão Pós-pausa

A potenciação pós-pausa da força de contração 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 esta 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 cálcio da SL e/ou pelo NCX e pode também ser acumulado em compartimentos intracelulares, tal como o RS. Como resultado, a quantidade de cálcio ativador dentro da célula é variável, dependendo das condições fisiológicas. Como a quantidade de cálcio estocado pode aumentar em 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 o grau de atividade de transporte 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 cálcio ativador para promover o relaxamento de cardiomiócitos de ratos e apenas 7% do total da concentração de cálcio ativador em coelhos.

Dessa forma, o efeito da duração da pausa sobre a potenciação da Fc varia de acordo com a 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 (VASSALO & MILL, 1988). Por outro lado, no miocárdio de rato esta potenciação pós-pausa é mantida e se acentua mesmo após períodos longos de pausa (VASSALO 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 a elevadas temperaturas. Em contraste, aumentos da Fc após uma pausa diastólica prolongada

foram observados em corações de elasmobrânquios, condizente com um maior grau de desenvolvimento do RS nessas espécies quando comparados aos teleósteos, nos quais uma mínima potenciação pós-pausa da Fc é exibida (DRIEDZIC & GESSER, 1988).

Adicionalmente, alguns estudos ultraestruturais sugerem a existência de grandes diferenças no grau de desenvolvimento anatômico do 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 intracelular 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 escombrídeos (HOCHACHKA & HULBERT, 1978; KEEN et al., 1992) do que em anfíbios e agnatas (STALEY & BENSON, 1968; HELLE & STORESUND, 1975).

Uma exceção a este padrão é o muçum, *S. marmoratus*, um teleósteo de vida sedentária. HOCHACHKA & HULBERT (1978) descreveram uma extensa elaboração do RS interfibrilar no miocárdico ventricular dessa espécie, uma característica impressionante que, segundo esses autores, os levou a sugerir separar a ultraestrutura do coração de muçum da encontrada para as demais espécies de teleósteos já estudados. Além disso, os resultados obtidos por ROCHA (2004) são indicativos que o RS de *S. marmoratus* é funcional, oferecendo importante contribuição para o manejo do Ca^{2+} no seu músculo cardíaco em termos de acumulação e liberação deste íon, mesmo em condições fisiológicas.

Como a maioria das espécies de vertebrados inferiores estudadas até o momento apresenta RS ventricular pouco desenvolvido anatomicamente e relativamente insensível à ação da rianodina, o papel funcional dessa organela como fornecedora de cálcio para o acoplamento E-C dessas espécies tem sido considerado secundário ou ausente (THOMAS et al., 1996).

A significância do RS no acoplamento E-C cardíaco varia grandemente entre as diversas classes de vertebrados, entre diferentes espécies de um mesmo grupo filogenético e até mesmo 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 cálcio ativador. Em vertebrados ectotérmicos como algumas espécies de lagartos, rãs e peixes, assim como alguns mamíferos neonatos, o RS cardíaco é

relativamente esparso e a contração e o relaxamento são mais dependentes dos movimentos transarcolemiais de cálcio (FABIATO, 1983; BOSSEN & SOMMER, 1984; VORNANEN, 1996 a, b).

A maior parte dos teleósteos já estudada não apresenta RS funcional, dentre eles o bacalhau (*Gadus morhua*) a 10 °C e o “sea raven” (*Hemirhamphys americanus*) a 15 °C (DRIEDZIC & GESSER, 1988), o linguado (*Pleuronectes flesus*, HOVE-MADSEN & GESSER, 1989) a 15 °C e a carpa-cruciana (VORNANEN, 1996a) a 2 e 22 °C. O mesmo padrão foi registrado para espécies de teleósteos tropicais como o amboré (*B. Soporator*, 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 um RS funcional seria bastante plausível no sentido de permitir que esses animais desenvolvessem uma performance cardíaca condizente com o ambiente de ampla variação térmica em que naturalmente se encontram.

A ocorrência de um RS funcional nas temperaturas em que os peixes são encontrados na natureza não é comum. Alguns estudos indicam sensibilidade do RS à rianodina apenas em temperaturas elevadas e frequências de estimulação não fisiológicas. Mesmo em espécies de peixes que possuem um RS relativamente estruturalmente bem desenvolvido, como a truta-arco-íris (HOVE-MADSEN, 1992; MOLLER-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 (a partir de 15 °C; KEEN et al., 1994) e/ou frequências de estimulação subfisiológicas (0,2 a 0,4 Hz; HOVE-MADSEN & GESSER, 1989; MOLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; HOVE-MADSEN, 1992; SHIELS & FARRELL, 1997). Porém, estudos mais recentes têm demonstrado que o RS de truta é funcionalmente importante em frequências e temperaturas fisiológicas. Nessa espécie, a corrente de cálcio dos canais L é insuficiente, em termos quantitativos, para ativar completamente a contração (HOVE-MADSEN et al, 1998, 2001). Em *Lota lota*, TIITU & VORNANEN (2002) observaram que o RS atrial e ventricular é sensível à rianodina, mesmo a 1 °C, demonstrando a funcionalidade dessa organela como fornecedora de cálcio para a contração independente da temperatura testada.

Apesar das observações anteriores, a rianodina foi incapaz de reduzir a F_c na maioria dos vertebrados ectotérmicos de clima temperado sob condições fisiológicas, 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.

No presente estudo *H. unitaeniatus* apresentou a 25 °C uma potenciação pós-pausa da Fc nas preparações controle ($168,3 \pm 11,4$ %), que foi abolida após a utilização de rianodina ($108,6 \pm 4,7$ %). 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 as tiras atriais de atum, e TIITU & VORNANEN (2003) para o “burbot”, *Lota lota*. Porém, vale lembrar que o tecido atrial de varias 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*, observaram uma potenciação pós-pausa da Fc de aproximadamente 140% a 25 °C, sendo que a aplicação de 10 µM de rianodina aboliu completamente tal potenciação. Resultado semelhante foi obtido por OLLE (2003) para tiras ventriculares de traíra, *Hoplias malabaricus*, onde potenciações pós-pausa de aproximadamente 40% a 25 °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, verificou potenciações pós-pausa da Fc de 60 % e 20%, respectivamente, que também foram abolidas pela rianodina.

Assumindo que, como em mamíferos, a mitocôndria não é normalmente importante para suplementar o cálcio ao aparato contrátil, e que as características de ligação da rianodina sejam similares em mamíferos e em peixes, podemos sugerir que o cálcio responsável pela ativação das miofibrilas causando a contração muscular no tecido ventricular de *H. unitaeniatus* deve originar-se de pelos menos duas fontes: o meio extracelular e o RS, assim como também observado em pacu (ANELLI Jr. et al, 2004), curimatá, cascudo (RIVAROLI, 2002) e traíra (OLLE, 2003).

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 & FARRELL, 2000). Há também a sugestão de que elevações na temperatura aumentem a atividade do RS e,

conseqüentemente, seu grau de participação como fornecedor de cálcio ao aparato contrátil, o que se constituiria em uma estratégia adaptativa a elevações bruscas da temperatura (SHIELS & FARRELL, 1997).

RIVAROLI (2002) relatou que uma outra hipótese para explicar a presença de RS funcional é a posição sistemática em que se encontram as espécies. Revisando a filogenia das espécies estudadas, este autor constatou que todas as espécies neotropicais que apresentam RS funcional pertencem à superordem OSTARIOPHYSI. Reforçando esta hipótese, temos que as espécies de peixes nas quais não se constatou 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 (*Synbranchus marmoratus*) estudado por ROCHA (2004), também pertence à superordem ACANTHOPTERYGII, o que sugere um conservacionismo filogenético desta estrutura.

Nosso trabalho corrobora essa hipótese, visto que *H. unitaeniatus* pertence à superordem OSTARIOPHYSI, assim como *Hoplías malabaricus* (OLLE, 2003), pertencente à mesma família que o jeju. Porém, mais estudos envolvendo um número maior de espécies, famílias e superordens são necessários para se comprovar a hipótese filogenética da funcionalidade do RS.

Os resultados obtidos são indicativos de que a espécie estudada possui um RS funcional, oferecendo importante contribuição para o manejo de cálcio no seu músculo cardíaco em termos de acumulação e liberação deste íon.

4.2.4. Efeito da Adrenalina

Existem controvérsias a respeito do principal mecanismo de regulação do débito cardíaco em peixes, onde este seria mediado principalmente pelo controle do volume sistólico (FARRELL et al., 1992), ou como em mamíferos, principalmente em função da regulação da frequência cardíaca, principalmente em temperaturas elevadas (RANDALL, 1968). A regulação β -adrenérgica é particularmente importante pois é o meio fisiológico pelo qual o sistema nervoso simpático controla as propriedades

inotrópicas (desenvolvimento de força), lusitrópicas (relaxamento muscular) e cronotrópicas (frequência de contração) do coração (BERS, 2001).

O coração dos teleósteos apresenta inervação adrenérgica e também está sob a ação adrenérgica das catecolaminas circulantes produzidas pelo tecido cromafim (LAURENT et al., 1983). As células cromafim podem ser definidas como quaisquer células derivadas da neuroectoderme, innervadas 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 peixes carecem de glândulas adrenais verdadeiras, apenas sendo evidenciados agregados de células cromafins em diferentes órgãos, cuja localização varia de acordo com a espécie (SCHEUERMANN, 1993).

A influência da adrenalina sobre a contratilidade miocárdica se dá por diversos mecanismos. O efeito inotrópico positivo observado após a estimulação adrenérgica está normalmente associado ao aumento do influxo de cálcio transsarcolemal mediado pela transdução de sinal via estimulação β -adrenérgica, como visto em mamíferos (CARMELIET & VEREECKE, 1969) e em diversos teleósteos (SHIELS & FARRELL, 1997; RANTIN et al., 1998), permitindo a formação de um maior número de pontes cruzadas e, portanto, um aumento no desenvolvimento de tensão (SHIELS & FARRELL, 2000).

De acordo com BERS (2001), o mecanismo de transdução de sinal que ocorre após a ligação do agonista adrenérgico ao receptor β -adrenérgico localizado na SL ocorre da seguinte forma: primeiramente ocorre a ativação da proteína de membrana G_s (estimuladora) que, por sua vez, ativa a enzima adenilato-ciclase, formadora de AMPc. Este segundo mensageiro ativa a proteína quinase AMPc-dependente (PKA) por meio da dissociação da sua subunidade catalítica da regulatória. A subunidade catalítica da PKA, uma vez liberada, age em diversos locais, fosforilando proteínas como a troponina I, os canais L da SL e a proteína regulatória da atividade da SERCA, o fosfolambano. Os resultados destas modificações iniciam-se na SL, onde a PKA, ao fosforilar o canal L, altera sua dependência de voltagem para ativação e inativação, fazendo com que a corrente de cálcio seja ativada a uma menor voltagem, aumentando assim a probabilidade de abertura dos canais a menores despolarizações e, conseqüentemente, o influxo de cálcio pela SL. Além disso, a fosforilação do fosfolambano pela PKA faz com que mais cálcio seja armazenado no RS pelo aumento da atividade da SERCA. Por fim, a fosforilação da troponina I reduz sua afinidade pelo cálcio, levando a uma liberação mais rápida deste íon, contribuindo com a aceleração

do processo de relaxamento (efeito lusitrópico positivo). A quantidade de cálcio livre no citosol é então aumentada pela maior entrada de cálcio pelos canais L da SL que, além de contribuir diretamente com a entrada de cálcio ativador no citosol, provoca maior liberação de cálcio pelo RS através do mecanismo de liberação de cálcio cálcio-induzida. Assim, a liberação de cálcio do RS é aumentada tanto pela maior quantidade de cálcio armazenado pela atividade da SERCA, quanto pelo mecanismo de liberação de cálcio cálcio-induzida.

Todavia, não se pode excluir um possível efeito inotrópico positivo resultante da estimulação de receptores α -adrenérgicos (SHIELS & FARRELL, 1997). A estimulação de α -adrenorreceptores em mamíferos aumenta a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio e pode aumentar a concentração de cálcio intracelular pela ativação de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) (BENFEY, 1990). O IP₃ induz a liberação de cálcio do RS em células de músculo liso, mas também parece causar liberação de cálcio do RS em tecido muscular cardíaco, apesar da taxa de indução da liberação de cálcio ser menor que a liberação de cálcio cálcio-induzida (KENTISH et al., 1990). O papel do IP₃ no miocárdio de peixes, bem como a densidade de receptores de IP₃ na membrana do RS desses animais, são pouco conhecidos.

Embora os receptores α -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, *Oncorhynchus mykiss* (ASK, 1983; FARRELL et al., 1996), linguado, *Pleuronectes platessa* (ASK, 1983) e carpa, *Carassius carassius* (VORNANEN, 1989), mas podem mediar tais efeitos no miocárdio de enguia-americana, *Anguilla anguilla* (PEYRAUD-WAITZENEGGER et al., 1980) e perca, *Perca fluviatilis* (TIRRI & LETHO, 1984).

Adicionalmente, de acordo com FARRELL & JONES (1992), a resposta cardíaca à estimulação adrenérgica em peixes é dependente, em grande escala, da densidade dos subtipos adrenérgicos (α - e β -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 possam exercer uma ação sinérgica para produzir os efeitos adrenérgicos no coração de peixes.

A adrenalina está presente em concentrações tônicas nanomolares (10⁻⁹ M) na circulação de peixes em repouso, assim garantindo a manutenção de um tônus

adrenérgico no coração tanto *in vivo* quanto *in vitro* (SHIELS & FARRELL, 2000). Por outro lado, uma concentração aguda de adrenalina (10^{-6} M) correspondente ao nível adrenérgico plasmático observado durante estimulação adrenérgica máxima, observada em resposta a condições estressantes, tais como altas temperaturas, manuseio e exercício intenso (SHIELS & FARRELL, 2000).

Essa elevada concentração de adrenalina circulante aumentaria a disponibilidade de cálcio ao aparato contrátil, assim aumentando o gradiente transarcolemal de cálcio por meio da maximização dos mecanismos de transporte iônicos através da SL. Foi o que se observou para o jeju, uma vez que a adrenalina promoveu um aumento na Fc de aproximadamente 20% já em resposta a uma concentração tônica deste agonista (10^{-9} M). Contudo, o efeito mais expressivo da adrenalina foi observado na concentração de 10^{-6} M (aproximadamente 225%).

Uma vez que o TPT foi alterado na maior concentração de adrenalina (10^{-6} M), pode-se sugerir que os canais L da SL permaneçam abertos por um maior período devido à fosforilação desses canais pela adrenalina, assim aumentando o tempo de entrada de íons cálcio, o que também acaba por elevar a Fc. Por outro lado, uma vez que o THR não varia em resposta à elevação de adrenalina, pode-se sugerir que o miocárdio ventricular da espécie apresenta mecanismos eficientes para a extrusão de cálcio, mesmo quando a quantidade deste íon é aumentada pela estimulação adrenérgica, indicando que os mecanismos de transporte de cálcio responsáveis pelo relaxamento cardíaco não são passos limitantes para a contratilidade cardíaca da espécie quando em presença de elevadas concentrações de adrenalina.

4.2.5. Efeitos de incrementos na frequência de estimulação

Dentre os diversos 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 responsáveis por essas diferenças parecem ter relação com peculiaridades nos processos que envolvem a utilização do RS para a acumulação e liberação de íons cálcio para o acoplamento E-C (HADJU, 1969).

Embora a análise da tensão pós-pausa seja a maneira tradicional de se verificar a importância funcional do RS na regulação de íons cálcio em músculo isolado, é importante verificar a participação do RS em frequências fisiologicamente relevantes por meio do estudo da relação entre a força de contração e aumentos sucessivos na frequência de estimulação imposta sobre as tiras ventriculares na ausência e presença de rianodina (determinando a funcionalidade do RS na frequência observada

in vivo) e/ou adrenalina (determinando como se dá o manejo de cálcio quando há uma concentração tônica de adrenalina plasmática e também em condições de estresse).

A relação entre a força isométrica máxima e a frequência de contração, ou relação força-frequência, é documentada para diversas espécies de peixes (SHIELS et al., 2002). Para a maioria das espécies estudadas, essa relação mostra uma diminuição da Fc quando a frequência de estimulação aplicada sobre as tiras cardíacas é elevada. Esta relação inversa é denominada 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, redução no estado ativo e também 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 (SHIELS & FARRELL, 2000; SHIELS et al., 2002).

A análise da Fc e dos processos tempo-dependentes das tiras ventriculares de jeju, *H. unitaeniatus*, após incrementos na frequência de estimulação foi analisada com o objetivo de verificar uma possível limitação dos mecanismos envolvidos com o transporte de cálcio durante o ciclo cardíaco à medida que a frequência é elevada.

O pico de tensão indica a real capacidade inotrópica do coração (SHIELS & FARRELL, 1997). O presente estudo demonstrou que os diferentes tratamentos impostos (diferentes concentrações de adrenalina e aplicação de rianodina) afetaram o pico máximo de tensão com o seu efeito sendo variável de acordo com as diferentes frequências de estimulação. Além da Fc, o TPT sofreu reduções significativas com o aumento da frequência, refletindo uma redução frequência-dependente do tempo para o aporte dos íons cálcio às miofibrilas contráteis. Já o THR se manteve constante, com exceção do controle, onde sofreu reduções.

Devido às mudanças no desenvolvimento de Fc estarem diretamente relacionadas a mudanças na concentração de cálcio intracelular, a relação força-frequência negativa pode ser atribuída ao declínio frequência-dependente da concentração intracelular de cálcio, evidenciando uma menor capacidade de obtenção de cálcio livre a partir de reservas intracelulares nestes animais (SHIELS et al., 2002). Tal redução na capacidade de obtenção de cálcio livre pode estar associada a mecanismos sarcolemais de transporte destes íons insuficientes do ponto de vista funcional para a manutenção do inotropismo cardíaco a elevadas taxas de estimulação,

determinando indiretamente o grau de eficiência do acoplamento E-C na musculatura cardíaca (DRIEDZIC & GESSER, 1985).

Outras limitações importantes para a manutenção da Fc quando a frequência é aumentada são a distância de difusão intracelular que o cálcio deve percorrer 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 apenas funciona como fonte de íons cálcio para a contração, mas também desempenha papel fundamental como armazenadora deste íon no relaxamento cardíaco pela tomada de cálcio dependente de ATP (SERCA). Assim, pode-se estabelecer uma correlação direta 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 então mecanismos de transporte sarcolemais de cálcio 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 *H. unitaeniatus* na temperatura de aclimação (25 °C). Ainda de acordo com esses autores, o decréscimo dos níveis de cálcio intracelular conforme a frequência de estimulação é aumentada pode tanto ser resultante tanto de uma diminuição do influxo de cálcio transarcolemal via canais voltagem-dependentes do tipo L e/ou do NCX, como também da menor liberação de cálcio do RS a elevadas frequências.

Em contraste, uma relação força-frequência positiva, ou seja, aumento da Fc durante incrementos na frequência de estimulação, é descrita para alguns grupos de vertebrados quando submetidos a elevações iniciais na frequência de estimulação. Esse é o caso de tiras ventriculares de mamíferos, répteis, anfíbios e elasmobrânquios (DRIEDZIC & GESSER, 1985, 1988) e também do tecido atrial de atuns, *K. pelamis* (KEEN et al., 1992). Porém, esta relação torna-se negativa em frequências mais elevadas.

As frequências cardíacas máximas encontradas *in vitro* para tiras ventriculares de *H. unitaeniatus* superam a frequência cardíaca *in vivo*. Tal resultado corrobora os resultados obtidos por DRIEDZIC & GESSER (1985), indicando que os miócitos cardíacos não estão trabalhando *in vivo* no limite máximo de capacidade de seu acoplamento E-C. Isso indica haver a atuação de mecanismos intrínsecos ao tecido

miocárdico na modulação da frequência cardíaca e/ou ocorrência de limitações fisiológicas no músculo isolado não relacionados à regulação de cálcio.

A redução da Fc em aproximadamente 35% a 0,2 Hz após a aplicação de rianodina indica que o RS é potencialmente funcional e contribui significativamente para a manutenção da tensão isométrica a 25 °C, exercendo um papel importante no manejo de cálcio quando consideradas as frequências observadas *in vivo* (redução de aproximadamente 25%). Assim, foi observada uma redução progressiva no papel do cálcio intracelular para a manutenção da Fc com o aumento da frequência, uma vez que os resultados obtidos nas preparações CTRL e RIAN se aproximaram à medida que frequências superiores às verificadas *in vivo* foram utilizadas.

Quando considerada a frequência cardíaca obtida *in vivo*, o inotropismo negativo provocado pela rianodina (redução de 25%) foi superior ao efeito deste alcalóide descrito para espécies de peixes que comprovadamente apresentam RS funcional em frequências fisiológicas, como a cavala-do-pacífico, *Scomber japonicus* (redução de 20%; SHIELS & FARRELL, 2000), truta-arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (redução de 15 %; HARWOOD et al., 2000). Além disso, o grau de redução de força ocasionado pela rianodina na frequência *in vivo* para o ventrículo de jeju foi semelhante ao descrito para pirambóia, *Lepidosiren paradoxa* (redução de 25%; COSTA et al., 2004) e atum, *Katsuwonus pelamis* (redução de 30%; KEEN et al., 1992).

A redução da Fc das tiras ventriculares de *H. unitaeniatus* promovida pela rianodina não foi acompanhada por alteração dos parâmetros tempo-dependentes, semelhante ao descrito por outros autores (HOVE-MADSEN, 1992; OLLE, 2003; ROCHA, 2004), onde o TPT e o THR não apresentaram sensibilidade à rianodina em nenhuma das frequências utilizadas. Esses resultados indicam que a ausência de participação do RS como fornecedor e seqüestrador de cálcio não afetou o tempo de disponibilização do cálcio ao aparato contrátil, mas, sim, a quantidade de cálcio disponível no citosol dos cardiomiócitos desta espécie (ROCHA, 2004). Segundo descrito por esse mesmo autor, outros mecanismos envolvidos com o fornecimento e extrusão de cálcio do citosol, como NCX, canais de cálcio e bomba de cálcio da SL, podem estar sendo suficientemente eficientes em promover um influxo e retirada deste íon da célula, já que a quantidade de cálcio que é ciclada a cada batimento é comprovadamente menor, conforme 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 *H.*

unitaeniatus: um componente afetado pela frequência de estimulação, dependente do fluxo iônico através da SL, e outro dependente do RS e sensível à rianodina, a qual reduz a Fc.

Adicionalmente, a adição de adrenalina tônica (10^{-6} M) às preparações já contendo rianodina (BA + RIAN) não resultou em alterações na Fc, TPT e THR somente tratadas com rianodina. Contudo, as tiras ventriculares apresentaram uma Fc menor em relação às preparações controle, efeito esse que deve exclusivamente refletir o já discutido efeito inotrópico negativo da rianodina, bem como os menores valores iniciais de TPT observados após o tratamento com este alcalóide, a despeito da ausência de alteração no THR. Visto que a aplicação de rianodina também não alterou esse último parâmetro, parece que a atividade do RS não é fundamental para o relaxamento nessa espécie.

Por outro lado, a estimulação adrenérgica máxima, mesmo associada ao bloqueio prévio do RS com rianodina (AA + RIAN) foi capaz de aumentar a Fc para valores muito acima daqueles observados para as preparações CTRL. Esse resultado permite que seja sugerido que a estimulação adrenérgica máxima seja capaz de compensar a ausência de funcionalidade do RS como fornecedor de cálcio, podendo exclusivamente o influxo transarcolemal deste íon promover aumentos significativos da Fc. Isso mostra que o ventrículo de *H. unitaeniatus* quando sob estímulo adrenérgico elevado pode facilmente aumentar a geração de força pelo aumento do influxo de cálcio via SL, mesmo sem uma contribuição das reservas intracelulares de cálcio. O aumento da Fc mediado pela alta concentração de adrenalina após adição de rianodina também foi observado em espécies de ambientes temperados como truta arco-íris (SHIELS & FARRELL, 1997) e cavala do Pacífico (SHIELS & FARRELL, 2000) e na espécie tropical *S. marmoratus* (ROCHA, 2004).

Além disso, pelo fato de a adrenalina ter sido capaz de compensar o efeito inotrópico negativo da rianodina no presente estudo, pode-se inferir que o mecanismo responsável pelo efeito inotrópico positivo da adrenalina observado no presente estudo não é resultante do aumento da liberação de cálcio pelo RS, mas, na verdade, de um incremento do influxo desse íon através da SL, quer seja pelos canais de cálcio tipo L e/ou pelo NCX (ROCHA, 2004).

Pode-se sugerir também que a grande quantidade de cálcio que entra através da SL após a estimulação adrenérgica máxima, responsável pelo acentuado inotropismo positivo, é ainda eficientemente retirada do citosol durante o relaxamento, uma vez que o THR permaneceu inalterado, mais uma vez indicando o elevado grau de

eficiência dos mecanismos transsarcolemais de transporte de cálcio responsáveis pelo relaxamento cardíaco da espécie (NCX e/ou Ca^{2+} -ATPase da SL).

5. CONCLUSÕES

As informações obtidas relacionadas às respostas *in vivo* e *in vitro* de *Hoplerythrinus unitaeniatus* permitem as seguintes conclusões:

- a. A f_H de *H. unitaeniatus* está próxima aos valores encontrados para as outras duas espécies da família Erythrinidae já estudadas, *Hoplias malabaricus* e *Hoplias lacerdae*;
- b. Não houve deterioração da força de contração das tiras ventriculares de *H. unitaeniatus*, indicando que estas são hábeis em manter a contração constante independentemente do tempo do experimento;
- c. Em *H. unitaeniatus*, a elevação da concentração de cálcio extracelular resultou em uma resposta inotrópica positiva, o que reflete a importância do cálcio extracelular para a geração de força. Além disso, os valores constantes de TPT e THR indicam que os mecanismos de transporte de cálcio responsáveis pela contração e pelo relaxamento cardíaco não são passos limitantes na contratilidade cardíaca desse peixe;
- d. A elevação da frequência de estimulação causou um efeito escada negativo, da mesma forma que o observado para a maioria das espécies de teleósteos;
- e. Os miócitos parecem não estar trabalhando, *in vivo*, no limite de capacidade do acoplamento E-C, visto que as frequências máximas observadas *in vitro* superam aquelas observadas *in vivo*.
- f. Nessa espécie, o retículo sarcoplasmático (RS) participa significativamente no manejo de cálcio durante o acoplamento E-C cardíaco, uma vez que o tratamento com rianodina resultou em uma diminuição da Fc;
- g. Altas concentrações de adrenalina foram capazes de reverter o efeito inotrópico negativo causado pela rianodina, mostrando que o influxo de cálcio pela sarcolema (SL) pode compensar a redução da Fc causada pela inativação funcional do RS;
- h. Em *H. unitaeniatus*, o cálcio responsável pela ativação dos miofilamentos deve derivar de pelo menos duas fontes: o espaço extracelular (evidenciado pelo aumento de Fc durante incrementos na concentração de cálcio extracelular e de adrenalina) e reservas internas, ou seja, o RS (evidenciado pelo efeito inibitório da rianodina).

- AHO, E. & VORNANEN, M. Ca²⁺ - ATPase activity and Ca²⁺ uptake by sarcoplasmic reticulum in fish heart: effect of thermal acclimation. *J. Exp. Biol.*, v. 201, pp. 232-252, 1998.
- ANELLI Jr., L.C. Função cardíaca do teleósteo tropical *Piaractus mesopotamicus*, pacu, submetido a diferentes condições térmicas. São Carlos, SP. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 64p., 2002.
- 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, Serrassalmidae). *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. 76A, n. 3, pp. 543-552, 1983.
- AZEVEDO, P. & GOMES, A.L. Contribuição ao estudo da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974). *Boletim de Indústria Animal*, v. 5, pp. 15-64, 1943.
- 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 Ca²⁺ uptake in intact cardiac myocytes. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 29, pp. 1699-1707, 1996.
- BENFEY, B.G. Function of myocardial adrenoceptors. *Life Sci.*, v. 46, pp. 743-757, 1990.
- BENNETT, A. Thermal dependence of muscle function. *Am. J. Physiol.*, v. 247, n. 16, pp. R217-R229, 1984.
- 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. 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^o 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. *Tissue & Cell.*, v.16, pp. 173-178, 1984.
- CAMERON, J. S. & BROWN, S. E. Adrenergic and cholinergic responses of the isolated heart of the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 70C, pp. 109-115, 1981.
- CARMELIET, E. & VEREECKE, J. Adrenaline and the plateau phase of the cardiac action potential. *Pflügers Arch.*; 313: 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.
- CHUGUN, A.; OYAMADA, T.; TEMMA, K; HARA, Y.; KONDO, H. Intracellular Ca²⁺ storage sites in the carp heart: comparison with the rat heart. *Comp.Biochem. Physiol.*, v. 123 (A), pp. 61-67, 1999.
- COOPER, R.; KRUM, H.; TZINAS, G.; SYLVIA, P.; BELLE, S. & KAUFMAN, L. A preliminary study of clinical techniques utilized with blue fin tuna (*Thunnus thunnus* Linnaeus); 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., RIVAROLI, L., RANTIN, F.T. & KALININ, A.L. Cardiac tissue function of the teleost fish *Oreochromis niloticus* under different thermal conditions. *J. Therm. Biol.*, 25:373-379, 2000.
- 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.; 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.
- 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. 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.
- 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, Jan. 1994.
- EISNER, D.A. et al. The control of Ca release from the cardiac sarcoplasmic reticulum: regulation versus autoregulation. *Cardiovasc. Res.*: v. 38, p.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.
- FARRELL, A. P. & JONES, D. R. The Heart. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. & FARREL, A. P. *Fish Physiology: The Cardiovascular System*. v. 12A. New York: Academic Press Inc., p. 1-88, 1992.
- FARRELL, A.P.; GAMPERL, A.K.; HICKIS, J.M.T.; SHIELS, H.A. & JAIN, K.E. Maximum cardiac performance of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) at temperatures approaching their upper lethal limit. *J. Exp. Biol.*, v. 199, pp. 663-672, 1996.
- FOWLER, H.V. Os peixes de água doce do Brasil. *Arq. Zool. Est. De S. Paulo*, v. 6, n. 2, pp. 205-404, 1950.
- FRANK, F.K.; BOLCK, B.; ERDMANN, E. & SCHWINGER, R.G.H. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovascular Research*. 57, 20-27, 2003.
- GERY, J. *Characoids of the word*. New York, TFH Publications, p. 672, 1977.

- GESSER, H. Cardiac force-interval relationship, adrenaline and sarcoplasmic reticulum in rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B.*, v. 166, pp. 278-285, 1996.
- GLASS, M.L.; RANTIN, F.T.; VERZOLA, R.M.M.; FERNANDES, M.N. & KALININ, A.L. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Fish Biol.*, v. 39, pp. 143-149, 1991.
- GODOY, M.P. Peixes do Brasil: Subordem Characoidei – Bacia do Rio Mogi-Guaçu. *Piracicaba: Franciscana*, v. 2, pp. 217-379, 1975.
- GODOY, M.P. Rio Iguaçu, Paraná, Brasil: reconhecimento da ictiofauna, modificações ambientais e usos múltiplos dos reservatórios. Florianópolis, Editora da UFSC, Eletrosul, 1979.
- GRAHAM, M.S. & FARRELL, A.P. The effect of temperature acclimation and adrenaline on the performance of a perfused trout heart. *Physiol. Zool.*, v. 62, n. 1, pp. 38-61, 1989.
- HADJU, S. Mechanism of the Woodworth staircase phenomenon in heart and skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v. 216, n. 1, pp. 206-214, 1969.
- HARWOOD, C.L.; HOWARTH, F.C.; ALTRINGHAM, J.D. & WHITE, E. Rate-dependence changes in cell shortening intracellular Ca^{2+} levels and membrane potential in single, isolated rainbow trout (*Onchorhynchus 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. & 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^+ and adrenaline. *J. Comp. Physiol. B.*, v. 159, pp. 61-69, 1989.
- 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. Quantification of Ca^{2+} uptake in the sarcoplasmic reticulum of trout ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, v. 275, n. 44, pp. R2070-R2080, 1998.
- 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^{++} uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 209, pp. 48-55, 1979.
- KALININ, A.L. Função respiratória de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em diferentes condições de O_2 ambiental: tomada de O_2 branquial e cutânea, medidas diretas e determinações indiretas dos parâmetros ventilatórios. São Carlos, SP, Brasil. 101p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 1996.
- KEEN, J. E.; FARREL, A P.; TIBBITS, G. F. & BRILL, R. W. Cardiac physiology in tunas. II. Effect of ryanodine, calcium, and adrenaline on force-frequency relationship in atrial strips from skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Can. J. Zool.*, v. 70, pp. 1211-1217, 1992.
- KEEN, J. E., VIANZON, D. M.; FARRELL, A P. & TIBBITS, G. F. Effect of temperature acclimation on the ryanodine sensitivity of the trout myocardium. *J. Comp. Physiol. B.*, v. 164, pp. 438-443, 1994.
- 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 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. *Am. J. Physiol.*, v. 258, pp. H610-H615, 1990.
- KIM, CS.; 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.

- LILLYWHITE, H.B.; ZIPPEL, K.C.; FARRELL, A.P. Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 124(A), pp. 369-385, 1999.
- 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.
- MILL, J.G.; VASSALO, 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.
- MOLLER-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.
- NOMURA, H. Dicionário dos peixes do Brasil. Editora Editorial Ltda., Brasília, p. 482, 1984.
- OLLE, C.D. Função cardíaca do teleósteo *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) submetido a diferentes condições térmicas. São Carlos, SP, Brasil. 94p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 2003.
- PEYRAUD-WAITZENEGGER, M.; BARTHELEMY, L. & PEYRAUD, C. Cardiovascular and ventilatory effects of catecholamines in unrestrained eels (*Anguilla anguilla*). *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.; GLASS, M.L.; KALININ, A.L. & VERZOLA, R.M.M. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. *Environ. Biol. Fish.*, v. 36, pp. 93-97, 1993.
- RANTIN, F. T., GESSER, H.; KALININ, A L.; GUERRA, C. D. R.; FREITAS, J. C. & DRIEDZIC, W. R. Heart performance, Ca²⁺ regulation, and energy metabolism at high temperatures in *Bathygobius soporator*, a tropical, marine teleost. *J. therm. Biol.*, 1998.
- 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.
- ROCHA, M.L. Manejo do cálcio intracelular e influência da temperatura sobre a contratilidade cardíaca de *Synbranchus marmoratus*. São Carlos, SP, Brasil. 102p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 2004.
- SANTER, R. M. Morphology and innervation of the fish heart. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 89, 1-102, 1985.
- SATHER, B.T. & ROGERS, T.A. Some inorganic constituents of the muscles and blood of the oceanic skipjack, *Katsuwonus 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 Ca^{2+} to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. *J. exp. biol.*, v. 200, pp. 1607-1621, 1997.
- SHIELS, H.A.; FREUND, E.V.; FARRELL, A.P.; BLOCK, B.A. The sarcoplasmic reticulum plays major role in atrial muscle of yellowfin tuna. *J. exp. Biol.* 202: 881-890, 1999.
- 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.; VORNANEN, M. & FARRELL, A.P. The force-frequency relationship in fish hearts – a review. *Comp. Physiol. Biochem. A*, v. 132, pp. 811-826, 2002.
- SPIX, J. B. & AGASSIZ, L. 1829-31 Selecta genera et species piscium quos in itinere per Brasiliam annos MDCCCXVII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I... colleget et pingendo curavit Dr J. B. de Spix.... Monachii. Selecta Piscium Brasiliam: Part 1: i-xvi + i-ii + 1-82, Pls. 1-48; Part 2: 83-138, Pls. 49-101. [Part 1 published June 1829, part 2 Jan. 1831; see Kottelat 1988, Whitehead & Myers 1971, Pethiyogoda & Kottelat 1998.
- 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. *J. exp. Biol.*, v. 199, pp. 1999-2009, 1996.
- 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.; 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.; 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.
- TIBBITS, G.F. Towards a molecular explanation of the high performance of the tuna heart. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 113A, pp. 77-82, 1996.
- TIITU, V. Temperature as a modifier of fish cardiac contractility. - University of Joensuu, 110 pp. University of Joensuu, PhD Dissertations in Biology, 2002.
- 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 muscle of fish with different temperature preferences. *J. Comp. Physiol.B.*, v. 173, pp. 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 potential in the ventricular myocardium by the $Na^{+}Ca^{2+}$ exchange mechanism. *Acta Physiol. Pharm. Lat. Am.*, v. 40, pp. 129-136, 1990.
- VORNANEN, M. Regulation of contractility of the fish (*Carassius carassius* L.) heart ventricle. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 94C, n. 2, pp. 477-483, 1989.
- VORNANEN, M. Effect of extracellular calcium on the contractility of warm- and cold- acclimated crucian carp heart. *S. 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. 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.; SHIELS, H. & FARRELL, A.P. Plasticity of excitation-contraction coupling in fish cardiac myocytes. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.*, v. 132, pp. 827-846, 2002.
- WIER, W. G. Cytoplasmic $[Ca^{2+}]$ in mammalian ventricle: Dynamic control by cellular processes. *Annu. Ver. Physiol.*, v. 52, pp. 467-485, 1990.
- WOOTTON, R.J. Ecology of teleost fishes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 404 pp, 1990.