

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



YAN COSTA GONÇALVES

EFEITOS DA MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS
RECEPTORES CANABINÓIDES CB2 NA FUNÇÃO
CARDÍACA DO TELEÓSTEO MATRINXÃ, *Brycon
amazonicus*

SÃO CARLOS -SP
2022

YAN COSTA GONÇALVES

EFEITOS DA MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS RECEPTORES CANABINÓIDES
CB2 NA FUNÇÃO CARDÍACA DO TELEÓSTEO MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Ciências Fisiológicas da Universidade
Federal de São Carlos, para obtenção do
título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Diana Amaral
Monteiro

São Carlos-SP
Agosto/2022

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe, que sempre lutou e motivou eu e minha irmã a ingressar em uma universidade para obtenção de um diploma. Mãe, conseguimos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a mim, chegar nessa etapa da graduação não foi fácil e somente eu, sei o que passei no decorrer desses seis anos para almejar tal feito. Filho de mãe solteira, empregada doméstica, aluno de escola pública com ensino precário e primeiro da família a ingressar em uma Universidade Federal. Sendo essa, apenas uma parte da minha história, me emociona. Perante as poucas oportunidades que tive, assim como milhares de outros brasileiros, chegar ao ensino superior público e não desistir ao longo desse processo, devido às diversas (o)pressões em que vivemos corriqueiramente, é uma conquista e privilégio estar agora finalizando esse ciclo.

Agradeço aos professores que de alguma forma me fizeram ficar mais apaixonado pela biologia e contribuíram na minha formação, sendo essa uma profissão encantadora, mas muitas vezes não reconhecida. Em especial, a minha orientadora Profa. Diana Monteiro, que diante do caos em meu 3º ano de graduação, nos primeiros dias em sala de aula ministrando com vigor, seriedade e paixão a disciplina de Fisiologia Animal Comparada 1, inspirou e elucidou o caminho para me tornar um pesquisador de qualidade. Obrigado pela (pa)ciência, puxões de orelha e aprendizado. Caminhar ao seu lado como orientando tem sido engrandecedor, Diana. Agradeço também, aos meus companheiros do LZBC.

Agradeço aos amigos que me acompanharam e me deram forças ao longo da graduação, em especial ao Igor, Andressa, Estrela, Samuel, Thaynara, Tia, Dani, Paulo e Raquel, que de alguma forma me motivaram em conversas, gestos e apoio, vocês fazem e fizeram a diferença na minha história, amo vocês. Com muito carinho, agradeço à minha amiga Natália, que está ao meu lado desde os 8 anos de idade, obrigado por todo o suporte. Amiga, te amo. Agradeço ao meu namorado, João Otávio, por todo carinho e palavras incentivadoras durante esse processo de finalização da graduação, te amo.

Agradeço a minha família, principalmente à minha mãe, Magda, minha irmã, Duda e minha vó Zefa. Sou muito feliz em ter vocês em minha vida. Sem você mãe, nada disso seria possível. Somente nós sabemos o que estar me formando significa, obrigado por ser essa mulher forte e cuidadosa, te amo com todas minhas forças. Com muito carinho, agradeço à minha madrinha Magali e minha prima Natássia, que sempre foram solícitas em relação às viagens para garantir minha matrícula na UFSCar, nunca esquecerei do carinho e suporte de vocês. Agradeço ao meu pai, Adalberto, pelo apoio financeiro.

Agradeço a **Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2020/13382-2)** pela concessão de minha bolsa de Iniciação Científica, sendo o TCC fruto da mesma e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ, Proc. 404688/2018-7)**, pelo auxílio à pesquisa concedido a minha orientadora.

“Life breaks free. Life expands to new territories. Painfully, perhaps even dangerously. But life finds a way.” – Ian Malcolm, Jurassic Park

Efeitos da manipulação farmacológica dos receptores canabinóides CB2 na função cardíaca do teleósteo matrinxã, *Brycon amazonicus*

YAN COSTA GONÇALVES¹

¹Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil.

RESUMO

Além dos seus efeitos clássicos conhecidos, como analgesia e prejuízo da cognição e aprendizagem, os canabinóides também têm sido relacionados à regulação das respostas cardiovasculares. Os receptores canabinóides CB1 e CB2 estão presentes em vários órgãos, incluindo o tecido cardíaco. Entretanto, os efeitos da ativação desses receptores na contratilidade cardíaca ainda são pouco conhecidos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as respostas do miocárdio ventricular após a ativação do receptor canabinóide CB2, utilizando peixe como modelo experimental, que se apresenta como ferramenta atrativa para o teste com terapias inovadoras. Foi investigado os efeitos da ativação dos receptores CB2 com um agonista seletivo sintético (HU-308) na contratilidade do miocárdio ventricular isolado e na expressão das proteínas envolvidas com o manejo de Ca^{2+} durante o acoplamento excitação-contração (AE-C). O tratamento com o agonista dos receptores CB2 aumentou a força de contração (Fc), a capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), além das taxas de contração e de relaxamento das tiras ventriculares. Manipulações farmacológicas com rianodina (bloqueio do retículo sarcoplasmático) e lítio (bloqueio do trocador Na^+/Ca^{2+}) indicaram uma contribuição relevante tanto do RS quanto do trocador Na^+/Ca^{2+} no AE-C no grupo tratado com o agonista HU-308. Adicionalmente, o HU-308 induziu aumentos significativos na expressão do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX) (159%), da bomba Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA) (28%), e do fosfolambano (PLB) (67%) nos ventrículos de matrinxã.

Dessa forma, a ativação dos receptores CB2 foi capaz de modular a concentração de Ca^{2+} transiente de forma a induzir respostas inotrópicas e lusitrópicas positivas. Os efeitos benéficos observados nesse estudo na contratilidade miocárdica sugerem que os receptores CB2 podem ser potenciais alvos terapêuticos em disfunções cardíacas.

Palavras-chave: Sistema endocanabinóide. Função cardíaca. Acoplamento excitação-contração. Proteínas de manejo do cálcio. Agonista canabinóide. Peixe.

ABSTRACT

In addition to their known classical effects, such as analgesia and impaired cognition and learning, cannabinoids have also been related to the regulation of cardiovascular responses. CB1 and CB2 cannabinoid receptors are present in several organs, including cardiac tissue. However, the effects of activation of these receptors on cardiac contractility are still unclear. The aim of this study was to evaluate ventricular myocardial responses after activation of the CB2 cannabinoid receptor, using fish as an experimental model, which is an attractive tool for testing with innovative therapies. The effects of cb2 receptor activation with a synthetic selective agonist (HU-308) on the contractility of the isolated ventricular myocardium and on the expression of proteins involved with Ca^{2+} management during excitation-contraction coupling (E-C coupling) were investigated. Treatment with the CB2 receptor agonist increased the contraction force (Fc), cardiac pumping capacity (CPC), besides the contraction and relaxation rates of ventricular strips. Pharmacological manipulations with ryanodine (sarcoplasmic reticulum blockade) and lithium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger blockade) indicated a relevant contribution of both the SR and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in E-C coupling in the HU-308 treated group. Furthermore, the treatment with HU-308 induced significant increases in the expression of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) (159%), sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) (28%) e phospholamban (PLB) (67%) in the ventricles of matrixã. In conclusion, CB2 receptors activation improved E-C coupling by increasing calcium-handling efficiency leading to a positive inotropic and lusitropic responses. The beneficial effects observed in this study on myocardial contractility suggest that CB2 receptors may be potential therapeutic targets in cardiac dysfunctions.

Keywords: Endocannabinoid system. Cardiac function. Excitation-contraction coupling. Calcium handling proteins. Cannabinoid agonist. Fish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Fibra cardíaca e seus componentes responsáveis pelo AE-C, durante a sístole e diástole 17
- Figura 2** - Exemplar de matrinxã (*Brycon amazonicus*) 21
- Figura 3** – Gráfico dos parâmetros de contratilidade das tiras ventriculares de *B. amazonicus* no grupo controle (Ct, n=17) e no grupo tratado (HU, n=28), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 – 2,4 Hz) 28
- Figura 4** – Gráfico dos parâmetros de contratilidade das tiras ventriculares de *B. amazonicus* no tratamento com lítio no grupo Ct (Ct+Li, n=14) e no grupo HU (HU+Li, n=19), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 – 1,0 Hz) 30
- Figura 5** - O papel indireto do trocador NCX no desenvolvimento da força isométrica Fc dos grupos Ct e HU, na ausência e presença de Li⁺ após incrementos de frequência (0,2 – 2,4 Hz) 31
- Figura 6** - Gráfico dos parâmetros de contratilidade das tiras ventriculares de *B. amazonicus* no tratamento com 10 µM de rianodina (RIAN) nos grupos controle (Ct+RIAN, n=10) e exposto (HU+RIAN, n=14), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 – 2,0 Hz) 33
- Figura 7** - O papel indireto do retículo sarcoplasmático (RS) no desenvolvimento da Fc dos grupos Ct e HU, na ausência e presença de rianodina (RIAN) após incrementos de frequência (0,2 – 2,6 Hz) 34
- Figura 8** - Valores da tensão isométrica (Fc - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas de 10, 30, 60, e 300 s

desenvolvidas pelas tiras ventriculares de *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n = 22) e exposto (HU, n = 42) 35

Figura 9 - Valores da tensão isométrica (Fc - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas de 10, 30, 60, e 300 s desenvolvidas pelas tiras ventriculares de *B. amazonicus*, dos grupos Ct (n = 22) e HU (n = 42) na ausência e na presença de Li⁺ (Ct+Li, n = 11) e (HU+Li, n = 23) 36

Figura 10 - Valores da tensão isométrica (Fc - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas de 10, 30, 60, e 300 s desenvolvidas pelas tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos Ct (n =22) e HU (n = 42) na ausência e na presença de 10 μM de rianodina (Ct+RIAN, n =10) e (HU+RIAN, n =16) 38

Figura 11 - Comparação entre os valores médios de expressão das proteínas NCX1, PLB e SERCA2a do tecido ventricular de *B. amazonicus* dos grupos Ct e HU (n = 6, i.e., 6 *pools* de ventrículos de 20 animais de ~ 500 mg.kg⁻¹) 40

Figura 12 - Comparação das razões NCX1/PLB, NCX1/SERCA2a, PLB/SERCA2a entre os grupos experimentais Ct e HU (n = 6, i.e., 6 *pools* de ventrículos de 20 animais de ~ 500 mg.kg⁻¹) 41

Figura 13 - Esquema da potenciação da força de contração isométrica (Fc) no protocolo pós-pausa 47

Figura 14 - Esquema do decaimento da força de contração isométrica (Fc) no protocolo pós-pausa 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Os valores referentes a unidades arbitrárias (U.A.) calculadas a partir da normalização das densidades ópticas de NCX1, PLB e SERCA2a no tecido ventricular de *B. amazonicus*, em função dos valores de densidade de β -actina ... 39

Tabela 2 - Razões da expressão das proteínas avaliadas, NCX1, PLB e SERCA2a
.....41

LISTA DE SIGLAS

AE-C – Acoplamento Excitação-Contração
AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina
CB2 – Receptor Canabinóide 2
CBC – Capacidade de bombeamento cardíaco
Ct – Grupo controle
Fc – Força de contração
HU – Grupo exposto ao agonista HU-308
NCX – Trocador Sódio-Cálcio
PLB – Fosfolambano
RS – Retículo Sarcoplasmático
RyR – Receptor de Rianodina
SEC – Sistema Endocanabinóide
SERCA – Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático
THR – *Time to half relaxation*
TPT – *Time to peak tension*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Caracterização do problema	14
1.2	Acoplamento excitação-contração	17
2	OBJETIVOS	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Animais	21
3.2	Delineamento experimental	22
3.3	Ensaio de contratilidade miocárdica <i>ex vivo</i>	23
3.4	Expressão das proteínas envolvidas no manejo de Ca ²⁺ durante o acoplamento excitação-contração	25
3.5	Análise estatística dos dados	26
4	RESULTADOS	27
4.1	Protocolo força-frequência	27
4.2	Protocolo pós-pausa	36
4.3	Expressão das proteínas envolvidas no manejo de Ca ²⁺ durante o acoplamento excitação-contração	40
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÃO	50
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do problema

O sistema endocanabinóide (SEC) foi descoberto devido ao interesse de pesquisadores em entender quais seriam os efeitos de agentes químicos psicoativos, como o Δ^9 -THC, presentes na planta *Cannabis sativa*, nos indivíduos que utilizavam essa planta como recurso pessoal, bem como quais seriam os receptores desses compostos químicos capazes de desencadear suas ações fisiológicas (PERTWEE, 2006). O sistema é composto pelos receptores CB1, descobertos em 1990 (MONTECUCCO & DI MARZO, 2012) e receptores CB2, descobertos em 1993 (STEFFENS & PACHER, 2012), além de seus respectivos agonistas canabinóides endógenos ou endocanabinóides e pelas enzimas que compõem suas vias de síntese e degradação. Segundo Feliciano et al. (2006), os receptores CB1 e CB2 são receptores acoplados a uma proteína G, os quais, uma vez ativados, desencadeiam cascatas de sinalização intracelular. Os receptores CB1 são encontrados majoritariamente nos terminais nervosos pré-sinápticos do sistema nervoso central, enquanto que os CB2 estão presentes, sobretudo, no sistema nervoso periférico, em células imunológicas, no sistema cardiovascular (SCV), nos rins, no cordão umbilical e no endotélio (MONTECUCCO & Di MARZO, 2012).

A revisão realizada por Montecucco & Di Marzo (2012) destaca que os dados disponíveis na literatura sugerem fortemente que os endocanabinóides não só desempenham um papel fundamental no controle da frequência cardíaca e pressão arterial em indivíduos saudáveis, mas também participam de condições patológicas, afetando o desempenho cardíaco e arterial, direta ou indiretamente, por meio da alteração de fatores de risco cardiometabólicos. Os efeitos cardiovasculares dos endocanabinóides são complexos, múltiplos e controversos, podendo envolver a modulação do fluxo autonômico dos sistemas nervoso central e periférico, bem como os efeitos diretos do miocárdio e da vasculatura (CUNHA et al., 2011).

Canabinóides e seus endógenos, bem como seus análogos sintéticos exercem uma variedade de efeitos no SCV, tanto *in vivo* como *in vitro*. Em roedores anestesiados, a anandamida, o THC e o agonista sintético HU-210 dos receptores CB1 e CB2 induzem hipertensão, bradicardia e redução da contratilidade cardíaca (PACHER et al., 2005a; 2005b). A ligação da anandamida e do agonista HU-210 aos receptores CB1 do miocárdio promove a redução, de maneira dose-dependente, do

desempenho contrátil do músculo atrial humano isolado, um efeito que é bloqueado pelo antagonista do receptor tipo 1, o AM251, implicando a existência de um inotropismo negativo mediado por CB1 (BONZ et al., 2003). A ativação dos receptores CB1 desencadeia uma série de efetores que levam à inibição da adenilato ciclase, estimulação de canais de K⁺ retificadores, ativação da via MAPK e a inibição de canais de Ca²⁺ (IBRAHIM & ABDEL-RAHMAN, 2014). Entretanto, o agonista dos receptores CB1 e CB2, o WIN-55,212-2 e o canabidiol reduz o tamanho da área do infarto e suprime arritmias ventriculares.

Por outro lado, evidências sugerem que a ativação dos receptores CB2 contribui na proteção do SCV. No SCV, a ativação de receptores canabinóides CB2 presentes nos cardiomiócitos, células endoteliais, músculo liso vascular e células imunes, pode limitar o processo inflamatório e reduzir lesões teciduais, como nos casos de aterosclerose, acidente vascular cerebral (AVC) e infarto miocárdico por meio da infiltração e recrutamento de macrófagos e leucócitos nos locais afetados (STEFFENS & PACHER, 2012). Os receptores CB2, por serem acoplados a proteína G, estão envolvidos com sinalizações intracelulares, desencadeando alterações no funcionamento canais iônicos de cálcio e potássio, na atividade da adenilato ciclase e nos níveis de adenosina-monofosfato-cíclico (AMPc) (DHOPESHWARKAR & MACKIE, 2014). Esses receptores tem sido alvos de estudos clínicos para tratamentos de algumas condições, como as dores crônicas e isquemias. De acordo com Duerr et al. (2014), no miocárdio de ratos, o eixo anandamida-CB2 auxilia os cardiomiócitos na regulação positiva de mediadores antioxidantes e na prevenção de apoptose. Steffens & Pacher (2012) utilizando camundongo como modelo animal, evidenciaram uma taxa maior na expressão desses receptores CB2 quando há alguma lesão ou patologia no miocárdio.

No músculo atrial isolado de rato, a ativação do receptor CB2 pelo agonista JWH 015 desencadeou uma resposta contrátil positiva que se correlacionou significativamente com o aumento da produção de cAMP (STERIN-BORDA et al., 2005). Há evidências experimentais que a ativação dos receptores CB2 está associada a respostas antioxidante, anti-inflamatória, anti-fibrótica e anti-apoptótica em patologias cardiovasculares, contribuindo na proteção desse sistema e reduzindo complicações cardiovasculares (DEFER et al., 2009; MONTECUCCO & DI MARZO, 2012; STEFFENS & PACHER, 2012). O agonista CB2 JWH-133 reduziu o tamanho

da área infartada no coração de camundongo no modelo de isquemia-reperfusão, aumentou a fosforilação da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2) e da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT-3), além de ter inibido o recrutamento de neutrófilos e a produção do ânion superóxido pelo miocárdio (MONTECUCCO et al., 2009). Ainda em modelo agudo de isquemia cardíaca em camundongo, o agonista do receptor CB2 AM1241, ativou a via da STAT3, reduziu o estresse oxidativo e a fibrose, promovendo a regeneração do miocárdio e a proliferação dos cardiomiócitos (WANG et al., 2014; HAN et al., 2017). Em suas pesquisas *in vitro* e *in vivo* usando camundongos como modelo experimental, Han et al. (2017) constataram o envolvimento dos receptores CB2 ativados pelo agonista sintético AM1241 na proteção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-DA) contra a doença arterial coronária. Adicionalmente, os autores verificaram redução de fibrose cardíaca na associação AM1241 e CTM-DA.

O entendimento sobre os ligantes dos receptores CB2 e os mecanismos de sinalização intracelular, são fundamentais na compreensão dos efeitos fisiológicos de sua ativação (DHOPESHWARKAR & MACKIE, 2014), uma vez que a relação desses receptores com o SCV não está totalmente elucidada. A contribuição científica no conhecimento das vias fisiológicas do SEC na função cardíaca e da influência da ativação dos receptores canabinóides CB2 no SCV, é de relevância na compreensão do papel do SEC, além de possibilitar novos tratamentos para patologias cardiovasculares. León et al. (2018) destaca que descobrir e investigar o funcionamento do SEC em relação ao SCV é de extrema importância no entendimento das fisiopatologias cardíacas relacionadas ao consumo da *Cannabis*. Considerando que um dos locais onde receptores canabinóides CB2 estão localizados é o músculo cardíaco e que o papel dos receptores CB2 na contratilidade miocárdica não é totalmente entendido ainda, surge a seguinte pergunta: “Os receptores canabinóides CB2 no miocárdio, quando ativados por um agonista sintético, podem modificar o padrão de contratilidade das tiras ventriculares do miocárdio e a expressão de proteínas envolvidas com o manejo intracelular do Ca^{2+} durante o acoplamento excitação-contração e, conseqüentemente, interferir na função cardíaca?

Vários instrumentos farmacológicos foram desenvolvidos para interferir no SEC. Alguns podem atuar diretamente nos receptores CB1 ou CB2 (i.e., agonistas ou antagonistas). Baseados na estrutura química do Δ^9 -THC, vários agonistas

canabinóides sintéticos foram desenvolvidos com diversas atividade e afinidades intrínsecas para os receptores de canabinóides (SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010). No presente estudo, será utilizado um agonista sintético específico dos receptores CB2, o HU-308 (Caymam Chemical). Ademais, a utilização de animais, principalmente de mamíferos, nas pesquisas científicas, tem trazido discussões acaloradas por parte de ativistas que são contra essa prática. Parte dos argumentos levantados por esse setor da sociedade é baseada no fato de que métodos alternativos são capazes de substituir a utilização desses animais (CONN & RANTIN, 2010). Em consequência das preocupações éticas sobre o uso de seres humanos e vertebrados superiores em pesquisas científicas, os peixes são cotados como potenciais substitutos em estudos nas áreas de toxicologia, farmacologia e genética, as quais normalmente empregariam ratos ou outras espécies de mamíferos. Dessa forma, os peixes estão sendo empregados como modelos experimentais alternativos e atrativos para testes com terapias inovadoras e pré-clínicas.

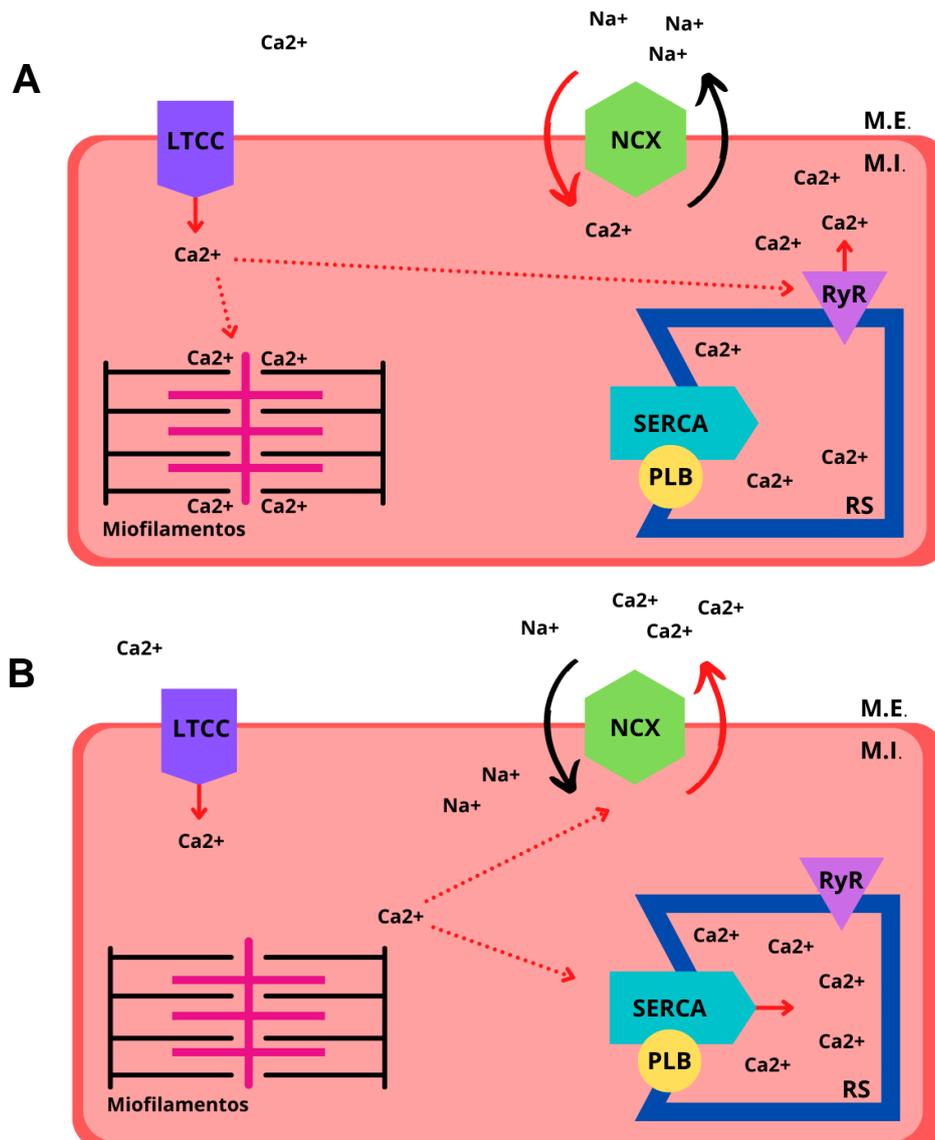
De acordo com Tortolero et al. (2010), *Brycon amazonicus*, popularmente conhecido como matrinxã, é um peixe nativo da bacia amazônica de significativa importância econômica, sendo bastante adaptável à piscicultura em tanques, com um grande potencial de crescimento. Desse modo, a utilização dessa espécie de peixe como modelo na realização de experimentos da pesquisa proposta é sustentada pela adaptação em tanques, rápido crescimento, baixo custo e alimentação por ração. Adicionalmente, a espécie apresenta semelhanças similaridades no AE-C e no manejo de cálcio mediado por proteínas que apresentam forte homologia com as expressas em cardiomiócitos de mamíferos superiores e cobaias, além de possuir um retículo sarcoplasmático (RS) responsável por cerca de 60% do fornecimento de Ca^{2+} na ativação dos miofilamentos contráteis (MONTEIRO et al., 2017; RISSOLI et al., 2017).

1.2 Acoplamento Excitação-Contração

A sequência de eventos que ocorre desde a despolarização do miócito até a contração muscular – consequente da sensibilização dos miofilamentos ao Ca^{2+} – é denominada AE-C. A principal diferença entre animais ectodérmicos e endodérmicos em relação ao aparato contrátil, é referente a origem do Ca^{2+} responsável pela interação com as proteínas contráteis (TIBBITS et al., 1992).

A ativação dos miofilamentos (Fig. 1A), actina e miosina, durante o AE-C resulta-se do aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} , o qual pode depender tanto da mobilização do Ca^{2+} intracelular proveniente do RS quanto do influxo de Ca^{2+} pela sarcolema (HOVE-MADSEN et al., 2000).

Figura 1. Fibra cardíaca e seus componentes responsáveis pelo AE-C, durante a sístole (A) e diástole (B). Meio extracelular (M.E); meio intracelular (M.I.); canal de cálcio tipo L (LTCC); trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX); receptores de rianodina (RyR); Retículo Sarcoplasmático (RS); cálcio ATPase do RS (SERCA); fosfolambano (PLB).



Fonte: autoral.

Em peixes a ativação contrátil é fortemente dependente do influxo de Ca^{2+} pela sarcolema. Logo, a função cárdica nos teleósteos é garantida pela corrente de Ca^{2+} oriunda do funcionamento dos canais de cálcio tipo L e dos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

atuando em seu modo reverso. Nos cardiomiócitos de mamíferos, a magnitude do Ca^{2+} derivado do influxo transsarcolemal não é suficiente para desencadear a ativação do aparato contrátil, tornando-o dependente da liberação dos estoques intracelulares proeminentes de Ca^{2+} do RS (RANTIN; KALININ; MONTEIRO, 2020).

Na membrana do RS localiza-se os receptores de rianodina (Ryr), responsáveis pela liberação dos estoques de Ca^{2+} , sendo esta considerada uma liberação Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} , uma vez que o Ca^{2+} é o ligante ativador desses receptores. Em contrapartida, o alcalóide rianodina, inativa irreversivelmente tais canais, bloqueando a liberação de Ca^{2+} do RS (ROUSSEAU et al., 1987). O Ca^{2+} que entra pela sarcolema somado aos íons Ca^{2+} liberados do RS desencadeiam o processo contrátil do músculo cardíaco (sístole).

Por outro lado, a redução da concentração citosólica de Ca^{2+} promove o relaxamento muscular (Fig. 1B). As vias de efluxo do Ca^{2+} citosólico, decorre da ação dos trocadores NCX e da Ca^{2+} -ATPase sarcolemal. Além da saída transsarcolemal, o Ca^{2+} pode ser armazenado no RS, por meio da atividade da bomba Ca^{2+} -ATPase-sarco(endo)plasmática (SERCA) (THOMAS et al., 1996)

Os trocadores NCX estão presentes na sarcolema dos miócitos e são sensíveis ao potencial de ação (P.A). Além de serem responsáveis pelo efluxo de Ca^{2+} , eles atuam em modo reverso no influxo de Ca^{2+} contribuindo para contratilidade (Lin et al., 2020), dependendo do potencial da membrana. A SERCA é responsável pela entrada e estocagem de Ca^{2+} no RS, contribuindo também para a diminuição dos níveis desse íon no citosol. Associada à SERCA, encontra-se a proteína fosfolambano (PLB) que, quando fosforilada aumenta a atividade da bomba e a captação de Ca^{2+} no RS, promovendo um maior estoque de Ca^{2+} no RS para as próximas contrações (BERNE, et al. 2010).

No miocárdio de mamíferos, o NCX e a SERCA são os mecanismos centrais na diminuição dos níveis Ca^{2+} transiente. Entretanto, em muitas espécies de peixes teleósteos, por possuírem um RS pouco desenvolvido, os responsáveis pela indução ao relaxamento muscular são o NCX e Ca^{2+} -ATPase sarcolemal (THOMAS et al., 1996). Não obstante, algumas espécies de peixes como curimatá (*Prochilodus lineatus*), traíra (*Hoplias malabaricus*) e matrinxã (*Brycon amazonicus*) possuem RS funcional, armazenando estoques intracelulares de Ca^{2+} (RIVAROLI et al., 2006; MONTEIRO et al., 2017; RISSOLI et al., 2017).

Nas últimas décadas, muitas descobertas importantes sobre canabinóides foram realizadas, mas muitos mitos e incertezas ainda persistem. A maioria das interações investigadas entre estes compostos canabinóides endógenos e xenobióticos, são estudos *in vitro* e sua relevância na farmacologia *in vivo* ainda não foi totalmente esclarecida (Di MARZO & PISCITELLI, 2015). É evidente, portanto, que esforços na pesquisa ainda precisam ser feitos para compreender a importância farmacológica dos canabinóides e, assim, avaliar plenamente sua relevância biológica/terapêutica.

Com base nos resultados pré-clínicos, a modulação farmacológica dos receptores CB2 pode ter um potencial terapêutico único no SCV, apesar de algumas controvérsias. Portanto, o uso de ligantes de receptores canabinóides como agentes terapêuticos precisa de uma consideração cuidadosa, não apenas no que diz respeito aos possíveis efeitos colaterais centrais, mas também pelo fato dos experimentos sobre a ativação dos receptores canabinóides no SCV descreverem resultados contraditórios.

2 OBJETIVOS

Diante das lacunas sobre o papel dos canabinóides no sistema cardiovascular, surge a hipótese de que a ativação do receptor canabinóide CB2 pode ser capaz de modular positivamente a contratilidade miocárdica, influenciando o AE-C e a expressão das proteínas responsáveis pela ciclagem de cálcio cardíaco. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo investigar os efeitos da ativação do receptor canabinóide CB2 na função cardíaca, através do tratamento com agonista seletivo, o HU-308 (Cayman Chemical), usando o peixe matrinxã (*Brycon amazonicus*) como um modelo experimental alternativo em testes com terapias experimentais. Cabe ressaltar que todos os protocolos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar nº 4997170718). Para tanto, os objetivos específicos do trabalho são:

- Determinar as respostas contráteis utilizando os parâmetros de força de contração isométrica (F_c); tempo para o pico de tensão (TPT – *time to peak tension*); tempo para a metade do relaxamento (THR - *time to half relaxation*), taxa de contração ($+dF_c/dT$ - derivada máxima positiva); taxa de relaxamento ($-dF_c/dT$ - derivada máxima negativa) das tiras ventriculares isoladas dos peixes controles e tratados com

o agonista HU-308;

- Analisar a capacidade do miocárdio ventricular da espécie em manter o AE-C após incrementos da frequência cardíaca nos animais controles e tratados com HU-308;
- Investigar a importância funcional do RS no acoplamento excitação-contracção em ambos os grupos experimentais;
- Avaliar o papel dos trocadores NCX no acoplamento excitação-contracção nos peixes controles e tratados com HU-308;
- Avaliar os efeitos da ativação dos receptores CB2 na capacidade de bombeamento cardíaco em ambos os grupos experimentais;
- Analisar a expressão das proteínas envolvidas no manejo de cálcio como SERCA, NCX e PLB no miocárdio ventricular dos peixes de ambos os grupos experimentais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Exemplares juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*, de ambos os sexos (47,0 ± 2,79 g), foram adquiridos da piscicultura Águas Claras, em Mococa-SP, e aclimatados em condições laboratoriais por 45 dias antes do início dos experimentos.

Figura 2. Exemplar de matrinxã (*Brycon amazonicus*).



Fonte: acesso livre.

Em laboratório, os peixes foram mantidos em tanques de 500 litros dotados de recirculação contínua de água, aeração constante e temperatura controlada (25 ± 1 °C). Essa espécie é encontrada majoritariamente na bacia amazônica, porém está presente em outras bacias hidrográficas e há um grande cultivo de matrinxã por todo o Brasil em sítios de pesca (VAL & HONCZARIK, 1995). É uma espécie onívora que em cativeiro, aceita rações comerciais, bem como subprodutos agroindustriais (GOULDING, 1980; IZEL et al., 1996). Isso torna a piscicultura de matrinxã extremamente viável, fazendo com que essa espécie modelo apresente facilidades quando se considera a pronta disponibilidade, o baixo custo e o fácil manuseio.

3.2 Delineamento experimental

Foram utilizados 40 exemplares de matrinxã (*Brycon amazonicus*). Os peixes foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, contendo 20 animais cada, conforme descrito abaixo:

- a. Grupo controle (Ct, n = 20):** animais que receberam injeção intraperitoneal de 0,5 ml de veículo (2,5 % DMSO em salina estéril com uma gota de Tween-20, SOLBRIG et al., 2013).
- b. Grupo tratado com o agonista sintético do receptor CB2 (HU, n = 20):** animais que receberam injeção intraperitoneal de 0,5 ml de 1 mg kg^{-1} do agonista seletivo do receptor CB2, o HU-308 (Caymam Chemical, >98%) diluído em veículo (2,5 % DMSO em salina estéril com uma gota de Tween-20, SOLBRIG et al., 2013).

A dose única do agonista foi escolhida com base em estudos realizados por

González et al. (2011) e Wang et al. (2012) que evidenciaram um efeito cardioprotetor dessa concentração no modelo isquemia-reperfusão do miocárdio de ratos diabéticos obesos e em pacientes com infarto agudo do miocárdio. Adicionalmente, essa dose utilizada do agonista é precisamente menor que a utilizada no exercício médico como no tratamento da epilepsia, mal de Parkinson e esquizofrenia, cujas doses de canabinóides empregadas ficam em torno de 20-40 mg.kg⁻¹ (SILVESTRO et al., 2019; BERGAMASCHI et al. 2011). Após 24 horas das injeções, os animais de ambos os grupos experimentais (Ct e HU) foram eutanasiados por concussão seguida de secção da medula espinal em conformidade com as normas da “American Veterinary Medical Association” (AVMA, 2013) e com a Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA, uma vez que qualquer anestésico empregado interfere na função cardíaca, induzindo inotropismo negativo pela inibição dos canais de Ca²⁺ tipo-L e redução do Ca²⁺ transiente (HANLEY et al., 2004). Após a eutanásia, os corações foram removidos cirurgicamente. Dez ventrículos foram utilizados nos ensaios de contratilidade miocárdica *ex vivo*. Os demais corações foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C para posterior análise da expressão por Western blot das proteínas envolvidas com o manejo de Ca²⁺ durante o AE-C.

3.3 Ensaios de contratilidade miocárdica *ex vivo*

As preparações experimentais foram efetuadas de acordo com os procedimentos adotados por BAILEY & DRIEDZIC (1990) e MONTEIRO et al. (2017). O coração, removido cirurgicamente, foi colocado em uma solução fisiológica gelada própria para teleósteos de água doce, com a seguinte composição (mM): 125,0 de NaCl, 2,5 de KCl, 0,94 de MgCl₂, 1,0 de NaH₂PO₄, 30,0 de NaHCO₃, 1,5 CaCl₂ e 10 de C₆H₁₂O₆, pH 7,2. A solução foi borbulhada com mistura carbogênica (2% CO₂ e 98% O₂) a 25 °C. Todos os protocolos experimentais foram utilizadas preparações de 4 tiras ventriculares obtidas do coração de um único peixe, após a retirada do bulbo arterioso e do átrio, para evitar contrações espontâneas do miocárdio. Cada uma das tiras ventriculares (0,0037 ± 0,0001 g), com diâmetro entre 3 a 4 mm, foi transferida para um banho contendo 25 mL da solução fisiológica descrita acima termostaticada a 25°C, dotado de borbulhamento constante com a mistura carbogênica. Uma extremidade da tira foi fixada através de uma espiral metálica, a um gancho construído

na extremidade de um eletrodo de estimulação. A outra extremidade foi conectada a um transdutor de força isométrica por meio de um fio de aço inoxidável.

Os eletrodos de estimulação foram acoplados a um estimulador elétrico (Grass S88, Grass Technologies, USA), que possibilitou a estimulação das tiras para o desenvolvimento da força isométrica (F_c) a diferentes taxas de estimulação elétrica. Os transdutores de força isométrica (Grass FT.03 Transducer, Grass Technologies, USA) foram acoplados ao sistema de aquisição e análise de dados Biopac MP150 (Biopac Systems, Inc., USA) por meio do software AcqKnowledge (Biopac Systems Inc., USA). Inicialmente, as tiras ventriculares foram estimuladas a uma taxa de 12 bpm (0,2 Hz, *steady-state*) e estiradas para aumentar a distância entre o transdutor e o gancho de fixação, até que uma relação constante entre o comprimento e o pico da força de contração seja obtida. Após estabilização, os seguintes protocolos experimentais foram aplicados:

a) Efeito do tempo: avaliou-se as respostas inotrópicas e os parâmetros tempo-dependentes durante um período de 30 minutos, à taxa de estimulação de 0,2 Hz (12 bpm).

b) Relação força-frequência: a capacidade do miocárdio em manter o AE-C em diferentes frequências foi avaliada por meio de incrementos na frequência de estimulação, a partir de 0,2 Hz, até os registros se tornarem irregulares.

c) Potenciação pós-pausa: as tiras estimuladas a 0,2 Hz foram submetidas a pausas na estimulação elétrica de 10, 30, 60 e 300 s. A primeira contração após a pausa foi analisada a fim de se avaliar capacidade de armazenamento intracelular de Ca^{2+} .

d) Importância funcional do RS na contratilidade miocárdica: os protocolos acima mencionados foram repetidos na presença do alcalóide rianodina adicionado ao banho. Quando utilizada em concentrações de 1 a 10 μM a rianodina se liga irreversivelmente aos canais de liberação de Ca^{2+} do RS bloqueando-os e, assim, inibindo a função da organela.

e) Papel do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX): os protocolos b e c foram repetidos na ausência de íons Na^+ e presença de lítio (Li^+), que provoca a inibição do total NCX, tanto do seu modo normal quanto reverso.

A área da secção transversa foi calculada utilizando o comprimento e massa úmida de cada strip e a densidade muscular de 1,06 $g\ cm^{-3}$ (Layland et al., 1995). A

força de contração (F_c – mN mm^{-2}) de cada tira ventricular foi calculada pela diferença entre os valores do pico da tensão isométrica e da tensão de repouso. Os parâmetros tempo-dependentes foram analisados em todos os protocolos e expressos em valores absolutos como TPT (“time to peak tension” - ms) e THR (“time to half relaxation” - ms) e através das taxas de contração (dF_c/dT - derivada máxima positiva – $\text{mN mm}^{-2} \text{ms}^{-1}$) e de relaxamento ($-dF_c/dT$ - derivada máxima negativa - $\text{mN mm}^{-2} \text{ms}^{-1}$). O produto da F_c pela frequência de estimulação foi usado para determinar o índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC – $\text{mN mm}^{-2} \text{min}^{-1}$) (MATIKAINEN & VORNAMEN, 1992) nos diferentes protocolos experimentais.

3.4 Expressão das proteínas envolvidas no manejo de Ca^{2+} durante o acoplamento excitação-contração

A expressão das proteínas Ca^{2+} -APTase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), fosfolambano (PLB) e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) foi analisada por *Western Blotting* (WB), de acordo com os procedimentos descritos por Monteiro et al. (2016) e Bocalini et al. (2012). Os ventrículos congelados foram homogeneizados em tampão hiperosmótico (sacarose 250 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pH 7,4) a 4 °C e centrifugados a 12000 gpm por 40 min a 4 °C. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 g a 4 °C por 60 min e os *pellets* foram ressuspensos em um volume reduzido (100 a 150 μL) de tampão Tris-EDTA (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4). Amostras de ventrículos de ratos Wistar passaram pelos mesmos procedimentos e foram utilizadas como controles positivos.

A quantificação de proteínas foi realizada segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1996). Cerca de 100 μg de proteína das amostras foram adicionadas em um tampão de carregamento de amostras (Laemmli buffer: Ureia 0,5 mM, SDS 0,17 mM, DTT 39 μM , Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0) em uma proporção de 1:1 e aquecidas a 95 °C por 5 minutos. Em seguida foram carregados os géis de SDS-poliacrilamida, 8% ou 12%, imersos em um tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 %) e submetidos a 80 V por 2 h a temperatura ambiente. Após o término da eletroforese, foi realizada a transferência elétrica das proteínas do gel para uma membrana de fluoreto de polividileno (PVDF) em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%, SDS 0,1 %) a 4 °C, em um Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA) com corrente constante de 230 mA durante 10

h. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 2 h em uma solução bloqueadora contendo leite desnatado (Molico) a 5% em tampão TBS-T (TrisHCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1 %, pH 7,5). As membranas foram incubadas overnight a 4 °C com os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal de coelho anti-SERCA2a (1,0 µg mL⁻¹, A1097, ABclonal Inc., U.S.A.); anticorpo monoclonal de camundongo anti-PLB (0,15 µg mL⁻¹, 05-205, Millipore Corporation, Billerica, MA); anticorpo policlonal de coelho anti-NCX1 (0,5 µg mL⁻¹, sc-32881, Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.) diluídos em uma solução de BSA 5% em um tampão TBS-T. Esses anticorpos foram previamente validados para a espécie (RISSOLI et al., 2017) e as proteínas SERCA, NCX e PLB possuem sequencias altamente conservadas entre as espécies de vertebrados (SIMMERMAN & JONES, 1998; ON et al., 2008; PEGORARO et al., 2011).

Após o período de incubação, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T e incubadas por 2 h a temperatura ambiente com os anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina: anti-coelho IgG (0,5 µg mL⁻¹, sc-2034, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) e anti-camundongo IgG (0,5 µg mL⁻¹, AP308A, Millipore Corporation, Billerica, MA). As bandas foram detectadas utilizando o sistema revelador Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA). As membranas foram digitalizadas, as bandas foram analisadas por densitometria no software ImageJ e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.) de densidade óptica normalizadas pela quantidade de β-actina (0,5 µg mL⁻¹, sc47724, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) detectado nas respectivas amostras.

Foram calculadas as razões entre as proteínas NCX1, PLB e SERCA2a após a quantificação em U.A. nos grupos experimentais (KUBO, et al., 2001; RISSOLI et al., 2017).

3.5 Análises estatísticas dos dados

Os resultados foram apresentados como valores médios ± Erro Padrão da Média (E.P.M.). Para comparações entre os grupos experimentais (Ct e HU), foi aplicado o teste-t de Student não-pareado ou seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocidasticidade (GraphPad Prism v. 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San

Diego, California USA). Para comparações dos parâmetros de contratilidade durante incrementos da frequência de estimulação, foi aplicada a análise de variância ANOVA de medidas repetidas complementada pelo teste de Dunnett de comparações múltiplas (GraphPad Prism v. 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA). As diferenças entre as médias ao nível de 5% ($p < 0,05$) foram consideradas significativas.

4 RESULTADOS

Todos os parâmetros de contratilidade do protocolo efeito do tempo não apresentaram diferenças relevantes em ambos grupos experimentais, Ct e HU, nos tempos estabelecidos de 10, 20 e 30 min. Portanto, esses resultados não foram apresentados graficamente.

4.1 Protocolo força-frequência

A Fig. 3 apresenta os valores médios da Fc, CBC, TPT, THR e taxas de contração e relaxamento das tiras ventriculares de matrinxã dos grupos Ct e HU, sujeitas a incrementos sucessivos de 0,2 Hz (ou 12 bpm) na frequência de estimulação.

Os resultados revelam que, para o grupo Ct, houve uma redução significativa e progressiva da Fc em relação aos valores iniciais (12 bpm) a partir de 1,2 Hz. No grupo Ct, a Fc atingiu o valor mínimo de $2,03 \pm 0,33 \text{ mN mm}^{-2}$, na frequência de 2,0 Hz ou 120 bpm, acima da qual os registros tornaram-se irregulares (Fig. 3A). A Fc do grupo HU reduziu significativamente a partir de 1,6 Hz, em relação aos valores iniciais (12 bpm). O valor mínimo da Fc no grupo HU foi $3,96 \pm 0,28 \text{ mN mm}^{-2}$ na frequência de 2,4 Hz ou 144 bpm (Fig. 3A).

No grupo exposto ao HU, os valores médios da Fc, assim como no índice de CBC, foram significativamente superiores (75% e 96%, respectivamente) em relação ao grupo Ct (Fig. 3A e 3B), em todas as frequências de estimulação elétrica.

A CBC (Fig. 3B) no grupo Ct apresentou aumento significativo a partir de 48 bpm em relação aos valores iniciais em 12 bpm. O valor máximo atingido no grupo Ct foi de $246,59 \pm 37,60 \text{ mN mm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ em 108 bpm. Entretanto, no grupo HU, o valor da CBC obtido a 12 bpm apresentou uma elevação significativa a partir de 36 bpm, chegando ao valor máximo de $551,72 \pm 38,79 \text{ mN mm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ em 144 bpm.

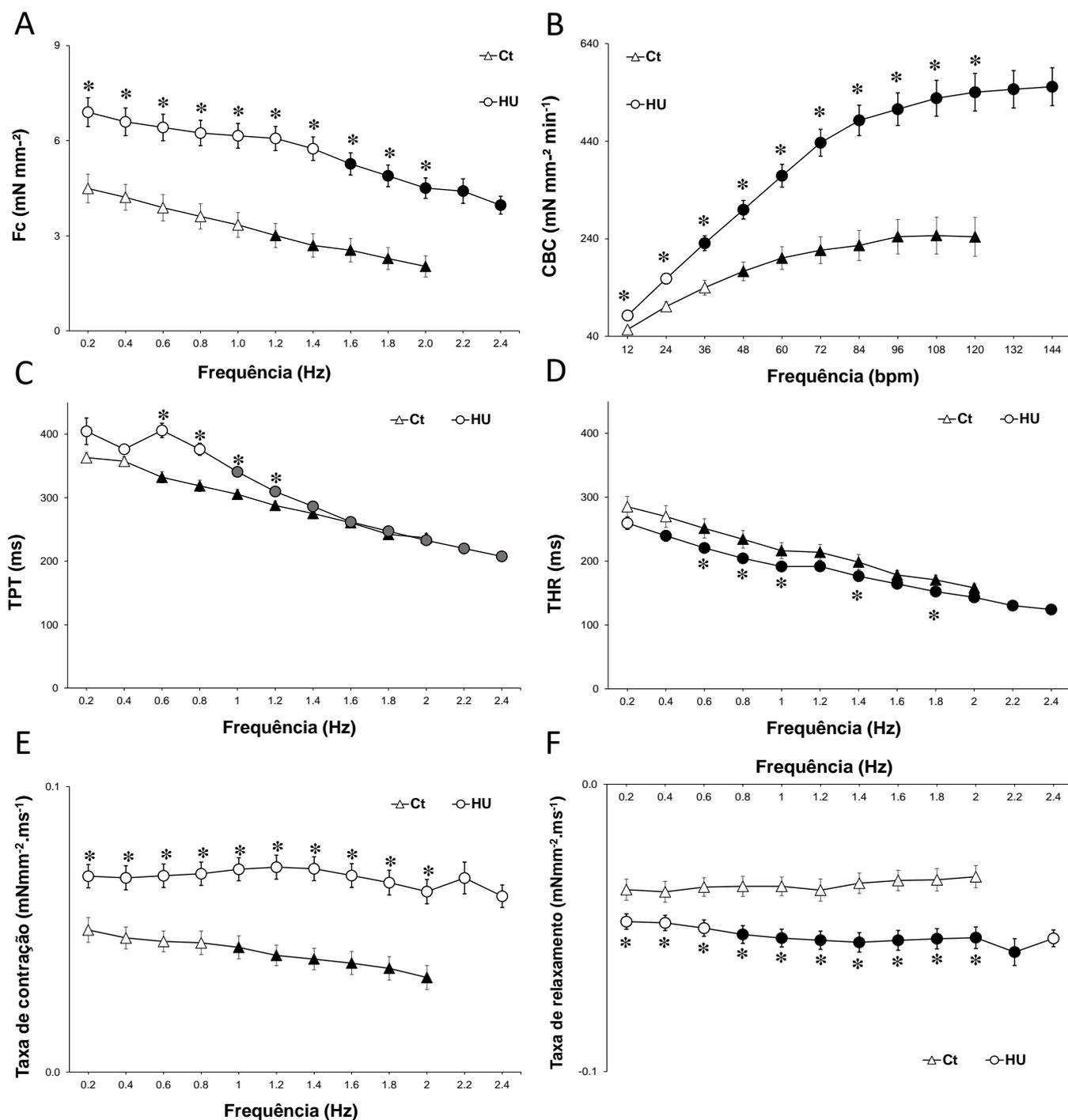
Os valores médios de TPT do grupo HU (Fig. 3C) foram significativamente

superiores (15%) em relação ao Ct, entre as frequências 0,6 Hz e 1,2 Hz. Em relação a 0,2 Hz, os valores de TPT reduziram significativamente a partir de 0,6 Hz no grupo Ct e 1,0 Hz no grupo HU. Os valores de TPT do grupo HU foram significativamente superiores (3%) em relação ao grupo Ct entre 0,6 Hz a 1,2 Hz.

Os valores de THR (Fig. 3D), apresentaram diferença significativa a partir de 0,4 Hz no HU e 0,6 Hz no Ct em relação ao valor obtido em 0,2 Hz. Já entre os grupos experimentais, houve diferenças significativas para este parâmetro entre as frequências de 0,6 Hz a 1,0 Hz, 1,4 Hz e 1,8 Hz (Fig 3D). Nesse parâmetro observa-se valores inferiores (11%) do grupo HU nas frequências de 0,6 Hz a 1,0 Hz, 1,4 Hz e 1,8 Hz, em relação aos do grupo Ct.

A taxa de contração (Fig. 3E) no grupo Ct, apresentou redução significativa a partir de 1,0 Hz em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz. Já no grupo HU, essa taxa se manteve constante em relação aos valores de 0,2 Hz, ao decorrer dos incrementos de estimulação elétrica. A taxa de relaxamento (Fig. 3F), no grupo Ct não apresentou alteração em relação aos valores iniciais em 0,2 Hz. Entretanto o grupo HU, houve um aumento significativo nas frequências de 0,8 Hz a 2,2 Hz, em relação aos valores observados em 0,2 Hz. É possível observar valores superiores do grupo HU em relação aos do grupo Ct em ambas taxas, sendo ~62% na taxa de contração e ~51% na de relaxamento.

Figura 3. (A) Força isométrica (Fc), (B) capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), (C) tempo para o pico de tensão (TPT), (D) tempo para 50% do relaxamento (THR), (E) taxa de contração, (F) taxa de relaxamento, desenvolvidos pelas tiras ventriculares de *B. amazonicus* no grupo controle (Ct, n=17) e no grupo tratado (HU, n=28), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 – 2,4 Hz). Valores expressos em média \pm E.P.M. Símbolos preenchidos indicam diferença significativa ($p < 0.05$) em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz (12 bpm) no mesmo grupo. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) na mesma frequência comparando os grupos experimentais.



Fonte: figura do autor.

A Fig. 4 apresenta valores médios dos parâmetros de Fc, CBC, TPT, THR, taxa

de contração e taxa de relaxamento das tiras ventriculares dos grupos Ct e HU, sujeitas a incrementos sucessivos de 0,2 Hz (ou 12 bpm) na frequência de estimulação na presença de lítio (Li⁺).

Os gráficos demonstram que ambos grupos experimentais na presença de Li⁺ alcançaram a frequência de 1,0 Hz. A Fc (Fig. 4A) tanto no grupo Ct+Li, quanto no grupo HU+Li, apresentou redução significativa de seus valores a partir de 0,4 Hz, atingindo valores mínimos de $0,35 \pm 0,75$ mN mm⁻² e $3,56 \pm 0,52$ mN mm⁻² respectivamente. Entre os grupos, houve uma preeminência (439%) nos valores médios obtidos do grupo HU+Li em relação ao Ct+Li.

A CBC (Fig. 4B) do grupo Ct+Li demonstrou um aumento significativo apenas nas frequências de 24 bpm a 36 bpm em relação aos valores iniciais de 12 bpm, chegando a $26,08 \pm 7,78$ mN mm⁻² min⁻¹ em 24 bpm. Entretanto, no grupo HU+Li houve um aumento significativo a partir de 24 bpm, em relação ao valor obtido em 12 bpm, atingindo $208,24 \pm 28,78$ mN mm⁻² min⁻¹ em 60 bpm. Os valores médios da CBC do grupo HU+Li foram significativamente superiores (566%) em comparação aos valores do grupo Ct+Li.

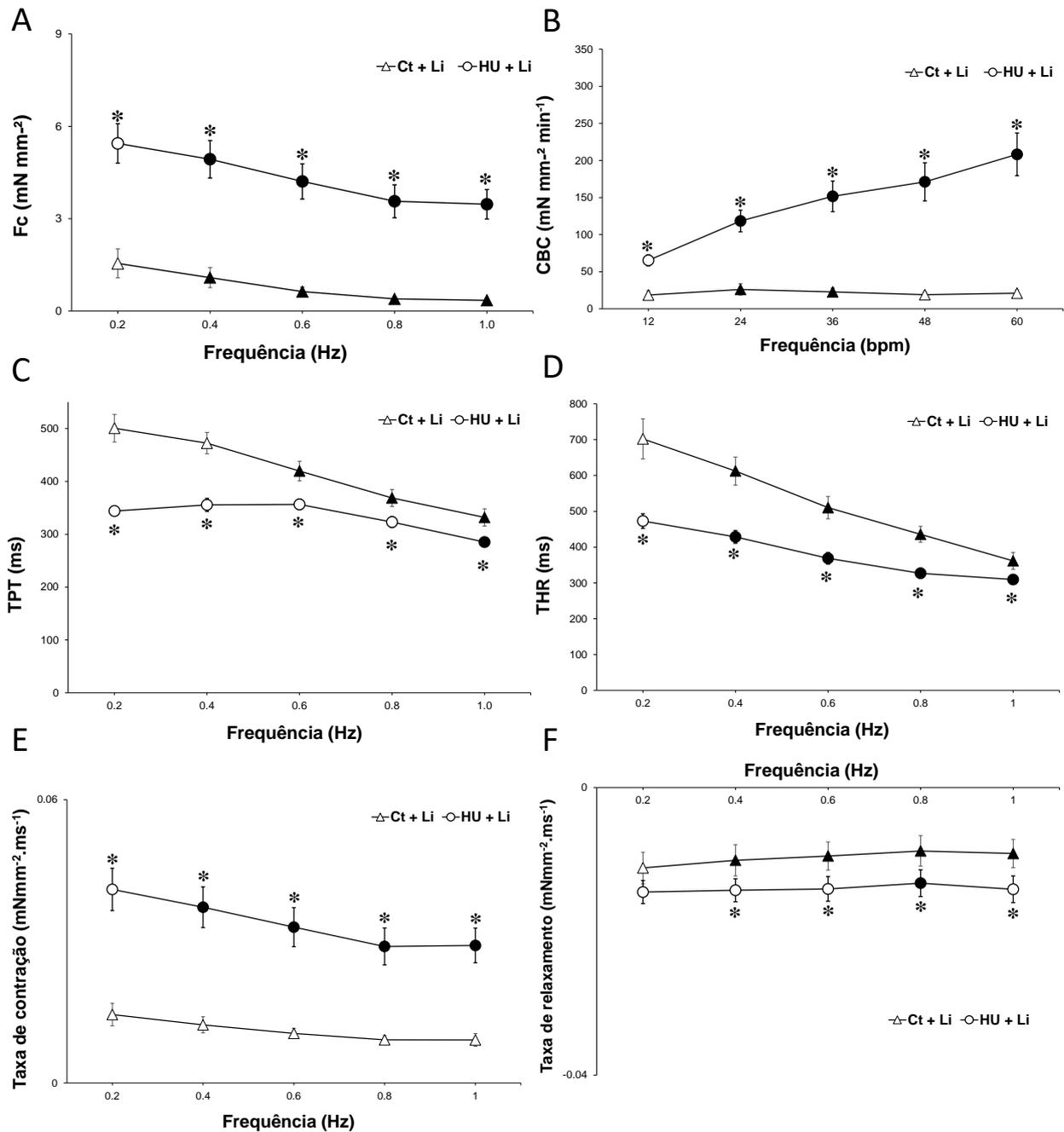
O TPT (Fig. 4C), no grupo Ct+Li reduziu seus valores a partir de 0,6 Hz em relação ao valor obtido em 0,2 Hz, atingindo o valor mínimo de $332 \pm 16,37$ ms. Já no grupo HU+Li o TPT apresentou um decréscimo significativo em seus valores apenas em 1,0 Hz em relação ao valor obtido a 0,2 Hz, atingindo o valor mínimo de $285 \pm 8,09$ ms. O grupo HU+Li apresentou valores inferiores (20%) em relação aos do grupo Ct+Li.

Em ambos grupos experimentais, os valores de THR (Fig. 4D) sofreram redução significativa a partir de 0,4 Hz em relação ao valor obtido em 0,2 Hz, com valores mínimos de $361,46 \pm 23,43$ ms no grupo Ct+Li e de $309 \pm 11,79$ ms no grupo HU+Li. O grupo HU+Li apresentou valores médios de THR significativamente inferiores (12%) em relação ao Ct+Li.

Os valores médios das taxas de contração no grupo Ct+Li (Fig. 4E) se mantiveram constantes. Entretanto, no grupo HU+Li, houve redução significativa dos valores da taxa de contração a partir de 0,4 Hz em relação ao valor obtido de 0,2 Hz. Os valores médios da taxa de relaxamento (Fig. 4F) sofreram redução significativa a partir de 0,4 Hz no grupo Ct+Li e apenas na frequência de 0,8 Hz no grupo HU+Li, quando comparados ao valor obtido em 0,2 Hz. Em ambos parâmetros, taxa de

contração e relaxamento (Fig. 4E, 4F), o grupo HU+Li apresentou aumento significativo (265% e 78%, respectivamente) em relação ao grupo CT+Li, em todas as frequências analisadas

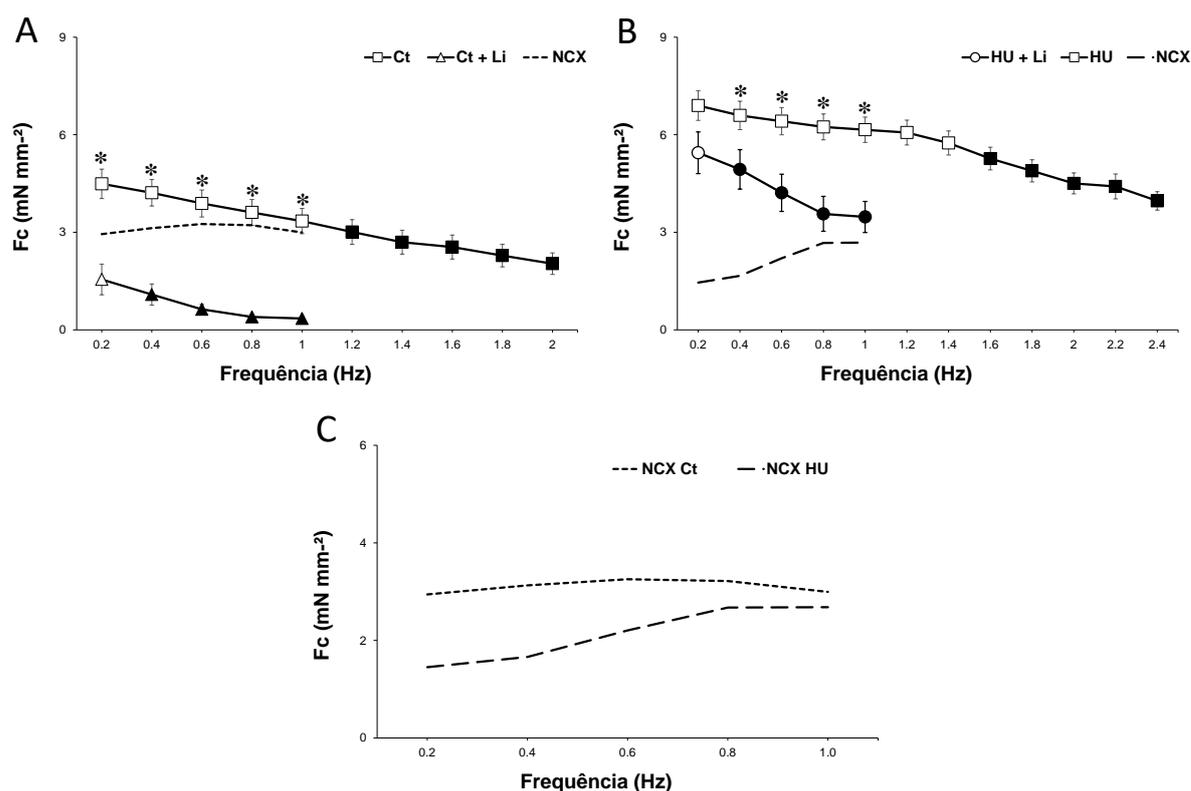
Figura 4. (A) Força isométrica (Fc), (B) capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), (C) tempo para o pico de tensão (TPT), (D) tempo para 50% do relaxamento (THR), (E) taxa de contração, (F) taxa de relaxamento, desenvolvidos pelas tiras ventriculares de *B. amazonicus* no tratamento com lítio no grupo controle (Ct+Li, n=14) e no grupo exposto (HU+Li, n=19), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 – 1,0 Hz). Valores expressos em média \pm E.P.M. Símbolos preenchidos indicam diferença significativa ($p < 0.05$) em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz no mesmo grupo. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos na mesma frequência.



Fonte: figura do autor

A Fig. 5 revela o papel indireto do trocador NCX nos grupos Ct (Fig.5A) e HU (Fig.5B), bem como a comparação entre os grupos (Fig. 5C). Qualitativamente, a contribuição relativa do trocador para o desenvolvimento de Fc no grupo HU é menor nas menores frequências de estimulação elétrica e aumenta ao decorrer do acréscimo da estimulação elétrica (Fig. 5C). No grupo Ct, essa contribuição permanece constante ao longo da estimulação de 0,2 Hz – 1,0 Hz e parece ser maior em relação ao grupo HU nas frequências abaixo de 0,6 Hz.

Figura 5. O papel indireto do trocador NCX no desenvolvimento da força isométrica (Fc) dos grupos (A) Ct e (B) HU, na ausência e presença de Li⁺ após incrementos de frequência (0,2 – 2,4 Hz). Valores expressos em média ± E.P.M. Linhas tracejadas indicam o subsídio indireto do trocador NCX no AE-C nos diferentes grupos experimentais. Símbolos preenchidos indicam diferença significativa ($p < 0.05$) em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz no mesmo grupo. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos na mesma frequência.



Fonte: figura do autor

A Fig. 6 apresentam valores médios dos parâmetros de Fc, CBC, TPT, THR, taxa de contração e taxa de relaxamento das tiras ventriculares dos grupos Ct e HU, sujeitas a incrementos sucessivos de 0,2 Hz (ou 12 bpm) na frequência de estimulação

na presença de 10 μM de rianodina (RIAN).

A Fc (Fig. 6A) no grupo Ct+Rian, apresentou redução significativa em seus valores médios a partir da frequência de 0,4 Hz, em relação ao controle, atingindo o valor mínimo de $0,41 \pm 0,04 \text{ mN mm}^{-2}$ em 1,6 Hz. Em contrapartida, o grupo HU+Rian manteve os valores de Fc constantes ao longo do incremento sucessivo da frequência de estimulação elétrica, chegando ao valor de $2,00 \pm 0,22 \text{ mN mm}^{-2}$ em 2,6 Hz. Além disso, o grupo HU+Rian apresentou valores de Fc significativamente superiores (277%) em relação ao Ct+Rian.

A CBC (Fig. 6B) no grupo Ct+RIAN apresentou um aumento significativo a partir de 24 bpm em relação aos valores iniciais em 12 bpm, atingindo em 72 bpm, o valor máximo de $40,41 \pm 3,78 \text{ mN mm}^{-2} \text{ min}^{-1}$. Igualmente, o grupo HU+RIAN apresentou um aumento significativo na CBC a partir de 24 bpm. Entretanto, o valor máximo da CBC foi registrado em 144 bpm, correspondendo a $551,72 \pm 38,79 \text{ mN mm}^{-2} \text{ min}^{-1}$. Os valores médios de CBC do grupo HU+RIAN foram significativamente superiores (366%) em relação ao grupo Ct+RIAN em todas as frequências testadas.

No grupo Ct+RIAN, os valores médios de TPT (Fig. 6C) apresentaram redução significativa a partir de 0,4 Hz em relação ao valor obtido em 0,2 Hz, atingindo os valores mínimos de $208 \pm 4,37 \text{ ms}$ em 1,6 Hz. Já o grupo HU+RIAN apresentou redução no valor de TPT somente a partir de 1,4 Hz, chegando aos valores mínimos de $192 \pm 3,53 \text{ ms}$ em 2,6 Hz. Os valores médios de TPT do grupo HU+RIAN foram significativamente superiores (28%) entre as frequências de 0,6 Hz a 1,6 Hz, em relação ao Ct+RIAN.

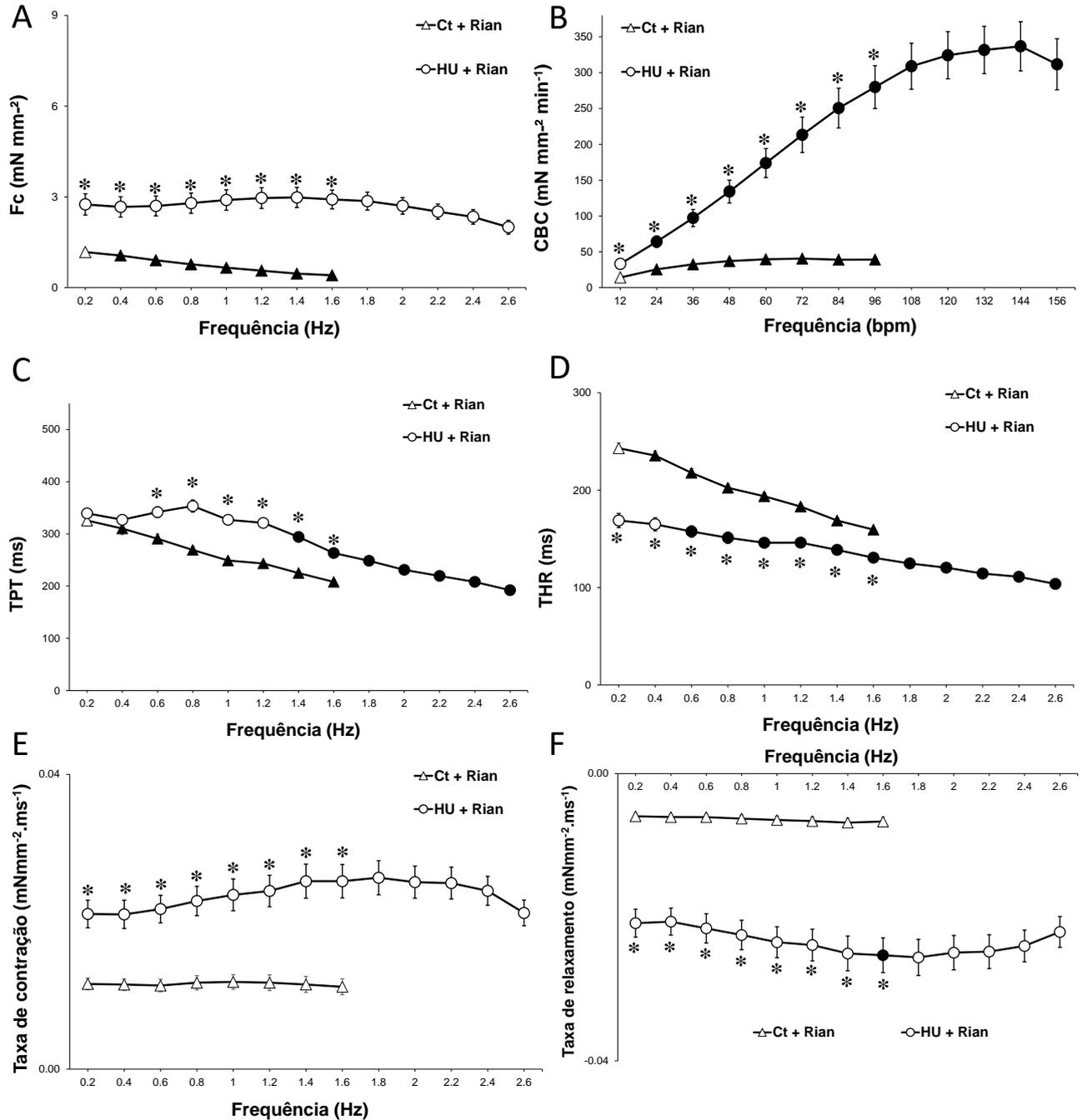
Em relação ao THR (Fig. 6D), houve redução significativa de seus valores médios a partir de 0,4 Hz no Ct+RIAN e de 0,6 Hz no HU+Rian, quando comparados aos valores obtidos em 0,2 Hz. O grupo Ct+RIAN atingiu valores mínimos de $160 \pm 2,12 \text{ ms}$ em 1,6 Hz, enquanto o grupo HU+RIAN chegou a valores mínimos de $104 \pm 2,71 \text{ ms}$ em 2,6 Hz. Os valores de THR do grupo HU+RIAN foram significativamente inferiores (25%) àqueles do grupo Ct+RIAN entre as frequências de 0,2 Hz e 1,6 Hz.

As taxas de contração e relaxamento (Fig 6E; 6F) apresentaram valores constantes em ambos grupos, Ct+RIAN e HU+RIAN, em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz. Apenas na frequência de 1,6 Hz, o grupo HU+RIAN exibiu um aumento significativo da taxa de relaxamento em relação ao valor obtido em 0,2 Hz. Os valores médios do grupo HU+RIAN foram significativamente superiores aos do Ct+RIAN tanto

para a taxa de contração (100%) quanto para a taxa de relaxamento (260%).

Figura 6. (A) Força isométrica (Fc), (B) capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), (C) tempo para o pico de tensão (TPT), (D) tempo para 50% do relaxamento (THR), (E) taxa de contração, (F) taxa de relaxamento, desenvolvidos pelas tiras ventriculares de *B. amazonicus* no tratamento com 10 μM de rianodina (RIAN) nos grupos controle (Ct+RIAN, n=10) e exposto (HU+RIAN, n=14), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 – 2,0 Hz). Valores expressos em média \pm E.P.M. Símbolos preenchidos indicam diferença significativa ($p < 0.05$) em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz no mesmo grupo. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos na mesma frequência.

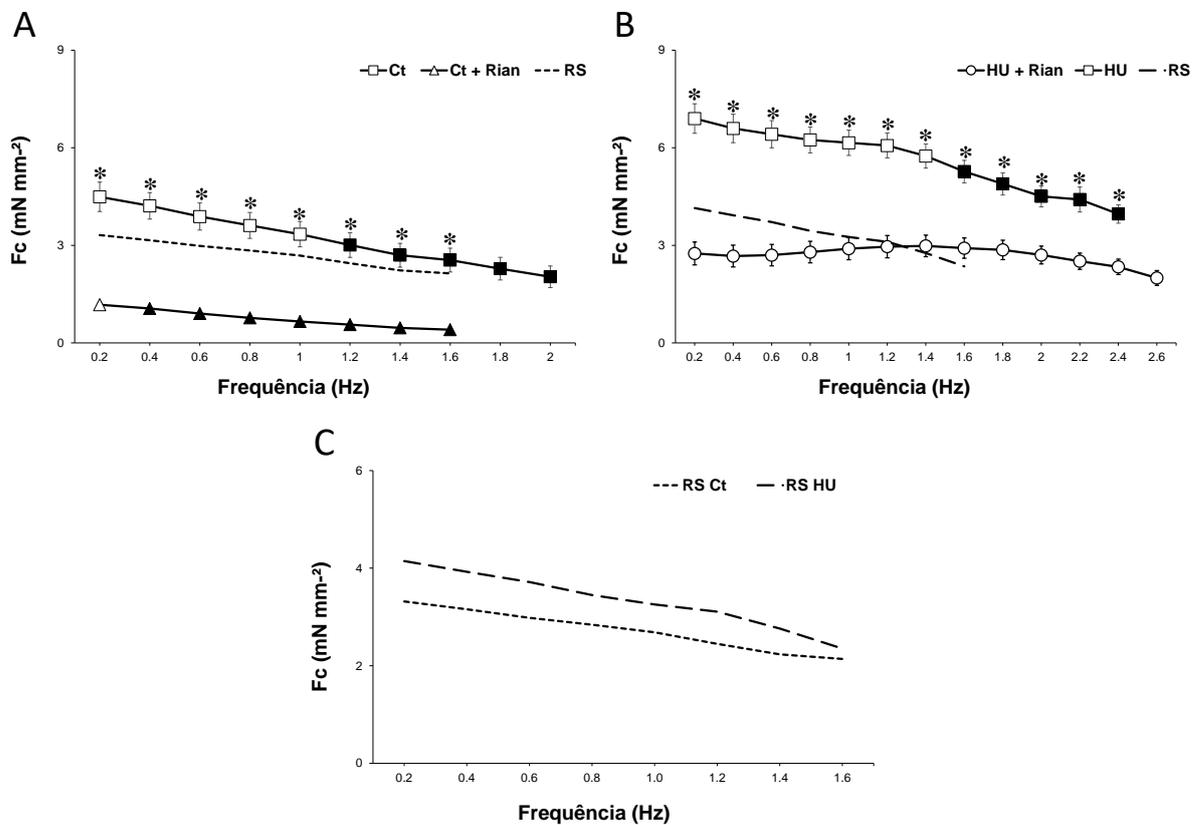
Fonte: figura do autor.



A Fig. 7 revela o papel indireto do retículo sarcoplasmático (RS) nos grupos Ct (Fig.7A) e HU (Fig.7B), assim como a comparação entre os grupos (Fig. 7C). O auxílio

da organela na contribuição da Fc em ambos grupos, reduz ao longo do aumento progressivo de estimulação elétrica de 0,2 Hz – 1,6 Hz. Entretanto, no grupo HU, a contribuição do RS para o desenvolvimento de Fc é maior, principalmente nas frequências mais baixas de estimulação elétrica (Fig. 7C).

Figura 7. O papel indireto do retículo sarcoplasmático (RS) no desenvolvimento da força isométrica (Fc) dos grupos (A) Ct e (B) HU, na ausência e presença de rianodina (RIAN) após incrementos de frequência (0,2 – 2,6 Hz). Valores expressos em média \pm E.P.M. Linhas tracejadas indicam o subsídio indireto do RS no AE-C nos diferentes grupos experimentais. Símbolos preenchidos indicam diferença significativa ($p < 0.05$) em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz no mesmo grupo. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos na mesma frequência.



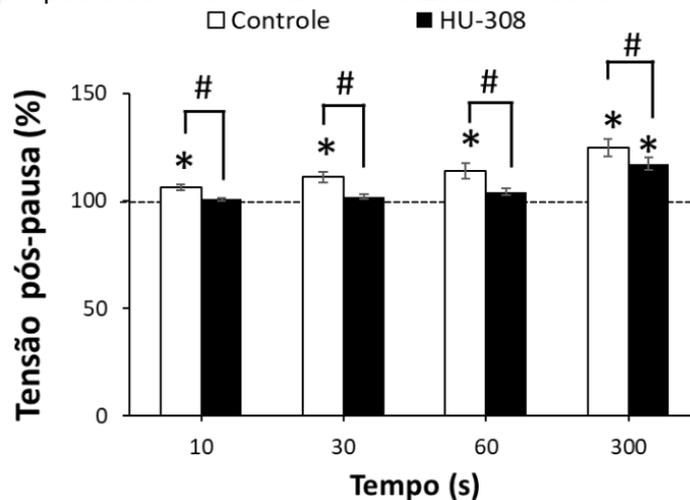
Fonte: figura do autor.

4.2 Protocolo pós pausa

A Fig. 8 apresenta a porcentagem de alteração da Fc da primeira contração após pausas de 10, 30, 60 e 300s em comparação a Fc obtida antes das pausas, no grupo Ct e HU. O grupo Ct apresentou potenciação pós-pausa da Fc em todos os tempos de repouso. Em contrapartida, o grupo HU exibiu potenciação da Fc apenas no tempo de 300s.

O grupo Ct demonstrou valores percentuais significativamente superiores da Fc pós-pausa em todos os tempos em relação ao grupo HU, sendo em 10s (6%), 30s (10%), 60s (13%) e 300s (24%).

Figura 8. Valores da tensão isométrica (Fc - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas de 10, 30, 60, e 300 s desenvolvidas pelas tiras ventriculares de matrixã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n =22) e exposto (HU, n =42). Valores expressos em média \pm E.P.M.. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em relação aos valores obtidos antes da pausa. (#) indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). A linha representa a tensão pré-pausa da tira ventricular normalizada em 100%.



Fonte: figura do autor.

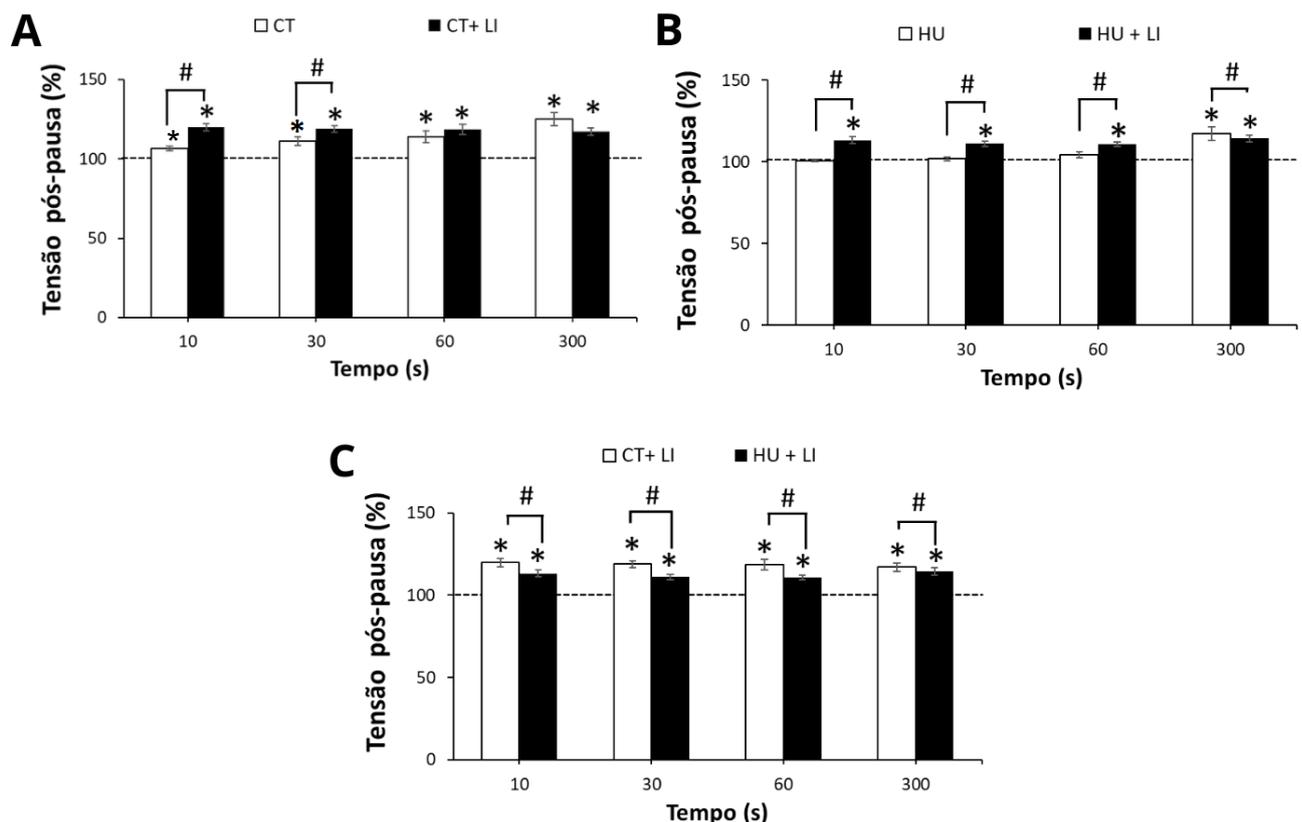
A Fig. 9 apresenta a porcentagem de alteração da Fc da primeira contração após pausas de 10, 30, 60 e 300s em comparação a Fc obtida antes das pausas, nos grupos Ct e HU, tanto na presença como na ausência de lítio. Foi observado potenciação pós-repouso da Fc (Fig. 9A) no grupo Ct após pausas de 10, 30, 60 e 300s. Igualmente, no grupo Ct+Li a potenciação da Fc foi detectada após todos os períodos de pausa. Os valores da Fc subsequente as pausas do grupo Ct+Li, foram significativamente maiores do que os observados no Ct, nas pausas de 10s (13%) e 30s (8%).

Na ausência de lítio, o grupo HU (Fig. 9B) apresentou potenciação, apenas na

pausa de 300s. No grupo HU+Li, as tiras ventriculares apresentaram potenciação da Fc em todas pausas diastólicas. O grupo HU+Li apresentou valores significativamente superiores de Fc pós-pausa em relação ao grupo HU nos tempos 10s (13%), 30s (12%) e 60s (13%) e apenas após 300s o grupo HU apresentou superioridade (2%).

Na comparação (Fig. 9C) entre os dois grupos na presença de lítio, Ct+Li e HU+Li, a potenciação da Fc foi registrada após 10, 20, 30 e 300s. Contudo, os valores da Fc subsequente as pausas no grupo Ct+Li, foram significativamente superiores aos do grupo HU+Li nos tempos 10s (6%), 30s (7%), 60s (6%) e 300s (5%).

Figura 9. Valores da tensão isométrica (Fc - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas de 10, 30, 60, e 300 s desenvolvidas pelas tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n =22) e exposto (HU, n =42) na ausência e na presença de lítio (Li) (Ct+Li, n=11) e (HU+Li, n=23). Grupos Ct e Ct+Li (A), Hu e Hu+Li (B), Ct+Li e Hu+Li (C). Valores expressos em média ± E.P.M.. (*) indica diferença significativa (p < 0.05) em relação aos valores obtidos antes da pausa. (#) indica diferença significativa (p < 0.05) entre os grupos experimentais (p < 0,05). A linha representa a tensão pré-pausa da tira ventricular normalizada em 100%.



Fonte: figura do autor.

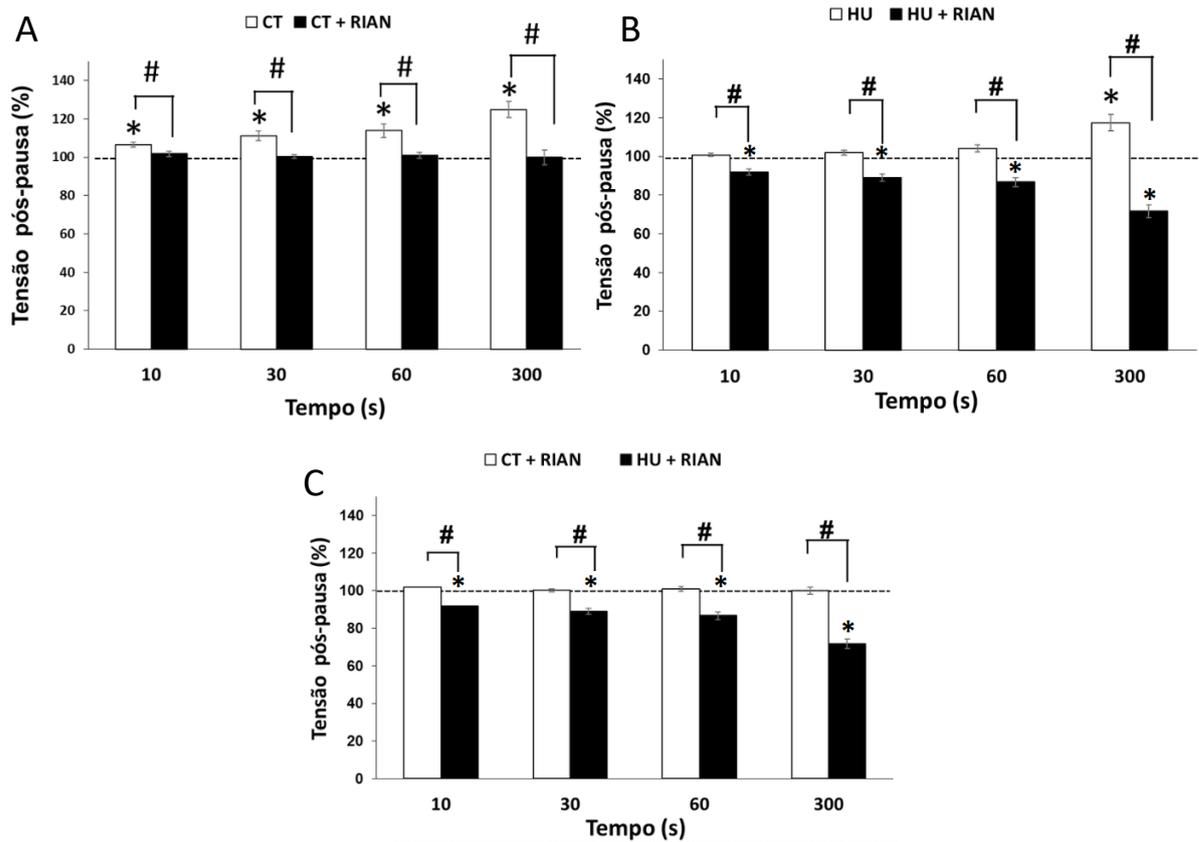
A Fig. 10 apresenta a porcentagem de alteração da Fc da primeira contração após pausas de 10, 30, 60 e 300s em comparação a Fc obtida antes das pausas, tanto

na presença como na ausência de rianodina.

Após o tratamento com o alcalóide, o evento de potenciação pós-pausa no grupo Ct+RIAN (Fig.10A) foi abolido, sendo assim, a Fc pós-pausa do grupo Ct sem rianodina foi significativamente superior ao Ct+RIAN em todos os tempos, 10s (4%), 30s (9%), 60s (11%) e 300s (18%). Adicionalmente, o grupo HU+RIAN não apresentou potenciação, entretanto, ocorreu o decaimento pós-pausa da Fc em todos os tempos estabelecidos de repouso (Fig. 10B). Portanto, os valores de Fc pós-pausa desse grupo, na presença de rianodina, foram significativamente inferiores ao grupo HU em todos os tempos, 10s (8%), 30s (10%), 60s (12%) e 300s (22%).

A Fig. 10C apresenta a comparação entre os grupos Ct+RIAN e HU+RIAN, sendo possível observar o decaimento significativo da Fc após todas as pausas analisadas no grupo HU+RIAN, evento que não ocorreu nas tiras do controle, também tratadas com rianodina, a qual aboliu a potenciação pós-pausa. Logo, o grupo Ct+RIAN apresentou valores significativamente superiores da Fc pós-pausa, em relação ao grupo HU+RIAN nos tempos de 10s (10%), 30s (11%), 60s (14%) e 300s (28%).

Figura 10. Valores da tensão isométrica (Fc - % da última contração precedente ao repouso) da primeira contração após pausas diastólicas de 10, 30, 60, e 300 s desenvolvidas pelas tiras ventriculares de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ct, n =22; Ct+RIAN, n =10) e exposto (HU, n = 42; HU+RIAN,n =16), na ausência e na presença de 10 μ M de rianodina. Grupos Ct e Hu (A), Ct e Ct+RIAN (B), Hu e Hu+RIAN (C), Ct+RIAN e Hu+RIAN (D). Valores expressos em média \pm E.P.M. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) em relação aos valores obtidos antes da pausa. (#) indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). A linha representa a tensão pré-pausa (100%) da tira ventricular.



Fonte: figura do autor.

4.3 Expressão das proteínas envolvidas no manejo de Ca²⁺ durante o acoplamento excitação-contração

Os valores, em unidades arbitrárias, da quantificação da expressão de SERCA2a, PLB e NCX1 encontram-se na Tabela 1 e na Figura 11.

Houve um aumento significativo (159%) da expressão de NCX1 no grupo tratado com o agonista em comparação ao controle. A proteína PLB também apresentou um aumento em sua expressão (67%) após tratamento com o HU-308, assim como a SERCA2a, cuja expressão aumentou significativamente (28%) no grupo tratado.

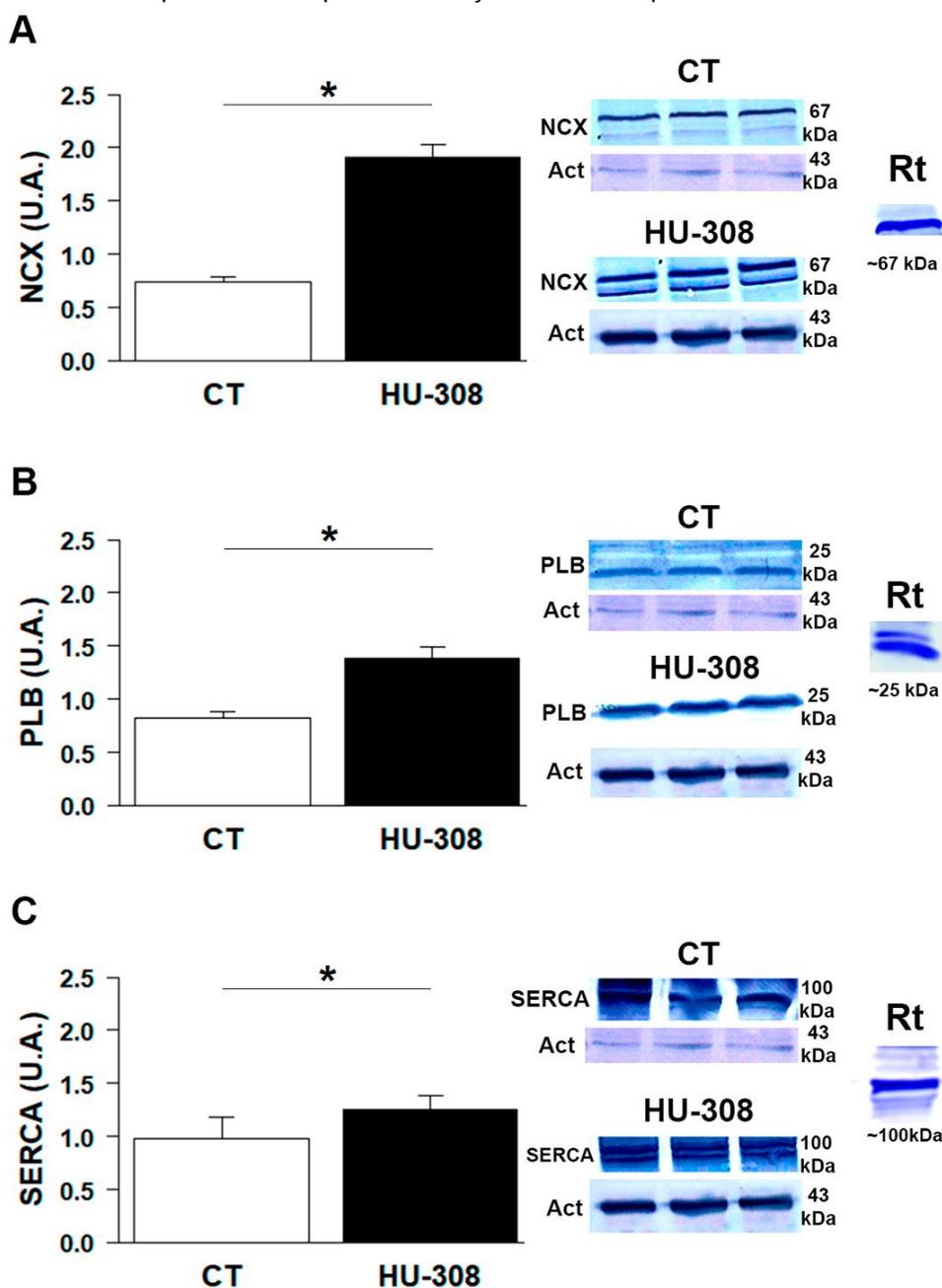
Ambos grupos experimentais, Ct e HU, expressaram o NCX1 com massa molecular de ~67 kDa. No grupo tratado com o agonista HU-308, ainda houve a expressão de 2 isoformas de NCX, a primeira apresentando massa molecular em torno de 67 kDa, semelhante ao controle, enquanto que a segunda isoforma aparenta ter entre 60-62 kDa. A proteína PLB foi expressa com massa molecular de ~25 kDa e, por fim, a SERCA2a foi expressa com ~100 kDa.

Tabela 1. Os valores referentes a unidades arbitrárias (U.A.) calculadas a partir da normalização das densidades ópticas de NCX1, PLB e SERCA2a no tecido ventricular de *B. amazonicus*, em função dos valores de densidade de β -actina. Grupos Ct e HU (n = 6, i.e., 6 *pools* de ventrículos de 20 animais de ~ 500 mg.kg⁻¹). Valores expressos em média \pm E.P.M. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos Ct e HU.

Proteína	Ct (U.A.)	HU-308 (U.A.)
NCX1	0,735 \pm 0,02	1,905 \pm 0,05 * (\uparrow 159%)
PLB	0,826 \pm 0,02	1,381 \pm 0,04 * (\uparrow 67%)
SERCA2a	0,981 \pm 0,08	1,252 \pm 0,04 * (\uparrow 28%)

Fonte: Tabela do autor.

Figura 11. Comparação entre os valores médios de expressão das proteínas NCX1, PLB e SERCA2a do tecido ventricular de *B. amazonicus* dos grupos Ct e HU (n = 6, i.e., 6 pools de ventrículos de 20 animais de ~ 500 mg.kg⁻¹), frente a ativação dos receptores canabinóides CB2. Valores apresentados em unidades arbitrárias (U.A.) calculadas a partir da normalização das densidades ópticas obtidas para as proteínas analisadas em função dos valores de densidade de β-actina. (A) Expressão do NCX1. (B) Expressão da PLB. (C) Expressão da SERCA2a. Valores expressos em média ± E.P.M. (*) indica diferença significativa (p < 0,05) entre os grupos experimentais. Rt: banda obtida a partir de amostra de tecido cardíaco de rato para controle positivo da ação dos anticorpos utilizados.



Fonte: Figura do autor.

As razões das proteínas avaliadas entre os grupos experimentais encontram-se na Tabela 2 e na Figura 12. Essas razões foram significativamente superiores no grupo exposto quando comparadas ao grupo Ct. Essa diferença observada foi de 55%

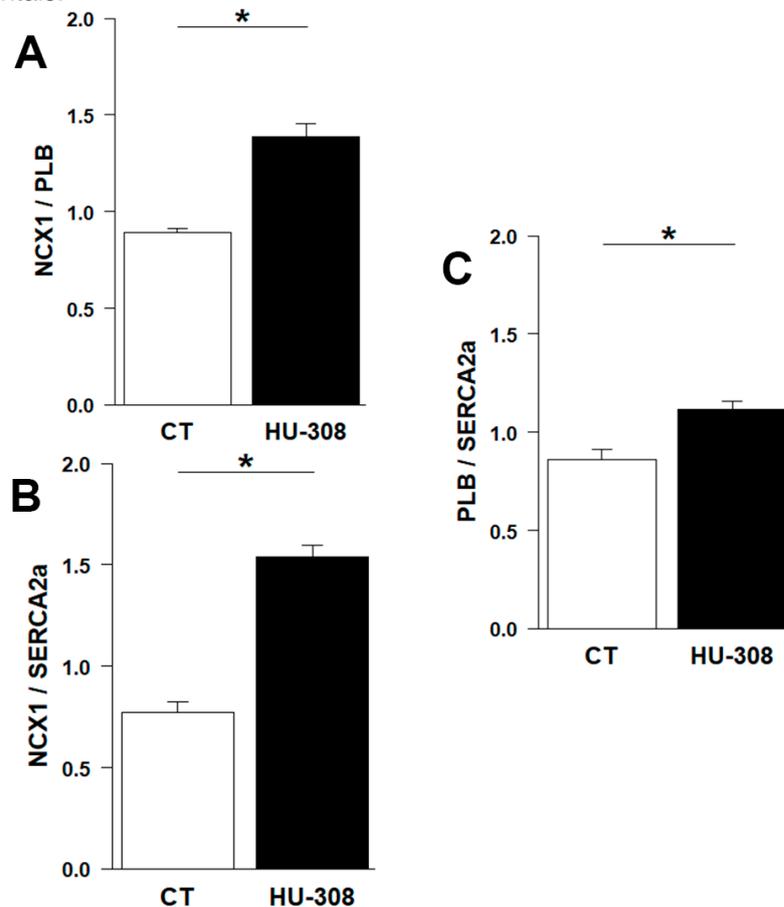
na razão NCX1/PLB, 103% na de NCX1/SERCA2a e 31% na PLB/SERCA2a.

Tabela 2. Razões da expressão das proteínas avaliadas, NCX1, PLB e SERCA2a, nos grupos experimentais Ct e HU (n = 6, i.e., 6 *pools* de ventrículos de 20 animais de ~ 500 mg.kg⁻¹). Valores expressos em média ± E.P.M. (*) indica diferença significativa (p < 0,05) entre os grupos experimentais.

Razão entre Proteínas			
Grupos	NCX1 / SERCA2a	NCX1 / PLB	PLB / SERCA2a
Ct	0,749 ± 0,05	0,889 ± 0,02	0,841 ± 0,05
HU-308	1,521 ± 0,06 *	1,379 ± 0,06 *	1,103 ± 0,04 *

Fonte: Tabela do autor.

Figura 12. Comparação das razões (A) NCX1/PLB, (B) NCX1/SERCA2a, (C) PLB/SERCA2a entre os grupos experimentais Ct e HU (n = 6, i.e., 6 *pools* de ventrículos de 20 animais de ~ 500 mg.kg⁻¹). Os valores expressos em médias ± E.P.M. (*) indica diferença estatística significativa (p < 0,05) entre os grupos experimentais.



Fonte: Figura do autor.

O tratamento com dose única de HU-308 (1 mg kg⁻¹), após 24 h, melhorou a performance cardíaca, aumentando a ciclagem de Ca²⁺ em decorrência de seus efeitos na regulação positiva da expressão das proteínas de manejo de Ca²⁺, como NCX1, SERCA2a e PLB. Essas alterações aumentaram o desenvolvimento da Fc e CBC, além das taxas de contração e relaxamento no miocárdio ventricular de *B. amazonicus*, desde de frequências cardíacas sub a supra fisiológicas.

O protocolo do efeito do tempo na contratilidade das tiras ventriculares foi realizado para averiguar se ao longo de todo o período experimental (30 min) não havia redução da capacidade contrátil. Esta é uma análise importante para validar o experimento, pois mostra que qualquer alteração na função contrátil decorre do protocolo aplicado e não de uma possível degradação celular em função do tempo experimental. Nenhum dos parâmetros contráteis registrados para os grupos Ct e HU sofreram alteração ao longo do protocolo efeito do tempo e, por isso, não foram apresentados. Todos os demais protocolos foram, então, desenvolvidos num período máximo de 30 min.

O controle sobre o fluxo de Ca²⁺ nas células musculares é fino e preciso, principalmente nos cardiomiócitos, pois qualquer desequilíbrio na regulação do Ca²⁺ transiente, pode desencadear fisiopatologias cardíacas (KHO, et al., 2010). A desregulação nas vias de cálcio é a principal causa de arritmias e falha no bombeamento cardíaco (OPBERGEN et al., 2017). A homeostase de Ca²⁺ nas células contráteis é mantida por proteínas reguladoras responsáveis pela fosforilação de canais de Ca²⁺, sendo uma dessas, a proteína quinase A (PKA) dependente de AMP cíclico (AMPC) (GHIGO et al., 2017).

O CB2 é um receptor acoplado a proteína G, que quando ativado é capaz de interagir com as vias de sinalização de AMPC, através da modulação na função da adenilato ciclase (STEFFENS & PACHER, 2012; DUFF et al., 2013; MALFITANO et al., 2014). Portanto, alterações desencadeadas na concentração de AMPC, após a ativação dos receptores CB2, podem influenciar na atividade da PKA. Sterin-Borda et al. (2005) verificaram que em corações de ratos tratados com o agonista JWH015, específico para o receptor CB2, houve um aumento significativo na força contrátil relacionado ao aumento da produção do AMPC e a consequente ativação da PKA, o que poderia modular positivamente a atividade dos canais de Ca²⁺ tipo-L (LTCC) e da SERCA promovendo uma maior amplitude de Ca²⁺ transiente.

Na literatura, trabalhos com outros tipos celulares, indicam a modulação positiva do Ca^{2+} transiente após a ativação dos receptores CB2. Em estudos com células endoteliais pulmonares bovinas (ZORATTI et al., 2004), foi evidenciado elevação de Ca^{2+} intracelular via ativação dos receptores CB2 ligados a fosfolipase C (PLC), após o tratamento com o endocanabinóide anandamida, havendo a liberação de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático, subsequente ativação dos receptores CB2. Sarott et al. (2021) descreveram que, na linhagem de células AtT-20 de camundongos, ocorreu um aumento do fluxo de Ca^{2+} citosólico após a ativação dos receptores CB2, na presença do agonista HU-308. Os autores apontam ainda que estudos sobre a investigação dos efeitos da ativação dos receptores CB2 pelo agonista sintético HU-308 são extremamente relevantes e importantes.

Adicionalmente, os receptores CB2 também interferem nas vias de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), tendo efeitos cardioprotetores em camundongos no modelo de isquemia-reperfusão por aumentar a tolerância dos cardiomiócito ao estresse oxidativo (MASLOV et al., 2016). Adicionalmente, a ativação do CB2 induz membros da família das MAPK a expressar genes, por ativar fatores de transcrição, ligados a proliferação, sobrevivência celular e respostas ao estresse oxidativo (STEFFENS & PACHER, 2012). Logo, os receptores CB2 desempenham funções nas vias de sinalizações da PKA, que estão diretamente ligadas a fosforilação de componentes envolvidos com a regulação de Ca^{2+} transiente (GHIGO et al., 2017), e, com as vias da MAPK envolvidas com a regulação da expressão gênica em cardiomiócitos.

Kaschima (2016) sugere o não intermédio dos receptores CB2 na contratilidade miocárdica. Contudo, Liu et al. (2020) estudando morte celular induzida por etanol no coração de camundongos, investigaram os efeitos da ativação dos receptores canabinóides CB2 perante a essa cardiomiopatia. Foi confirmado que a administração dos agonistas seletivos do receptor CB2, JWH-133 e AM1241, foi capaz de reduzir a fibrose cárdica e melhorar a função cardíaca, aumentando a eficiência da ejeção de sangue no ventrículo esquerdo. Adicionalmente, Li et al. (2017) investigando a toxicidade do antipsicótico clozapina no coração de camundongos frente o envolvimento dos receptores canabinóides, igualmente constataram uma melhora na função cardíaca após a aplicação dos agonistas sintéticos dos receptores CB2, AM1214 e JWH-133. Dessa forma, contrariando Kaschina (2016), esses estudos

demonstram alterações na função cardíaca frente a ativação dos receptores CB2.

Nossos resultados apontam para uma interação entre a ativação dos receptores CB2 e as vias de regulação do Ca^{2+} transiente e corroboram, portanto, as observações reportadas acima, sugerindo que há sim, um papel efetivo desses receptores na contratilidade miocárdica. Sendo assim, os efeitos desencadeados pela ativação dos receptores CB2, via PKA e/ou MAPK, poderiam explicar o inotropismo e lusitropismo positivos e o aumento da taxa de contração e da velocidade da ciclagem de Ca^{2+} induzidos pela administração de HU-308 no miocárdio de matrinxã, decorrentes da indução da expressão das principais proteínas responsáveis pela manutenção do AE-C.

Em geral, vertebrados basais exibem uma relação força-frequência negativa, em que a Fc diminui ao decorrer dos incrementos sucessivos da frequência de estimulação elétrica (SHIELS et al., 2002). Essa relação força-frequência negativa característica em peixes teleósteos pode estar associada ao curto tempo, nas frequências elevadas de estimulação, para restituição mecânica na remoção e liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (RS), ou devido a ineficiência no efluxo de Ca^{2+} na diástole, tornando o relaxamento contrátil incompleto e apresentando redução na Fc (SHIELS & FARREL, 1997).

Ambos grupos experimentais apresentaram uma relação força-frequência negativa. Entretanto, o grupo HU apresentou elevada Fc em todas frequências analisadas, resultando em uma elevada CBC. O cálculo da CBC é um índice relevante na avaliação de ensaios cardíacos isolados, pois reflete uma integração dos efeitos de mudanças na Fc frente a frequência de estimulação (SHIELS et al., 1999). Tanto para Fc quanto para CBC, o tratamento com o HU-308 deslocou as curvas de relação força-frequência para cima e para direita, refletindo o aumento na amplitude de Ca^{2+} transiente e uma maior capacidade do músculo isolado em manter o AE-C em frequências elevadas, uma vez que a frequência máxima suportada pelas tiras ventriculares isoladas passou de 2 para 2,4 Hz. As maiores taxas de contração e relaxamento no grupo HU, também evidenciam um aumento na taxa de ciclagem de Ca^{2+} e um lusitropismo positivo desencadeado pela ativação dos receptores CB2. Portanto, os efeitos da ativação dos receptores CB2 podem estar relacionados com o aumento da amplitude de Ca^{2+} transiente induzindo a elevação da força produzida.

Apesar das curvas da relação força-frequência terem sido deslocadas para

baixo e para esquerda quando o trocador NCX estava inibido por Li^+ , as tiras ventriculares do grupo HU foram capazes de manter todos os parâmetros contráteis acima dos valores médios observados no controle. Assim, a ativação dos receptores CB2 levou a uma maior contribuição do RS para a ativação dos miofilamentos, disponibilizando uma maior quantidade de Ca^{2+} ativador capaz de manter uma elevada Fc e CBC, em todas as frequências de estimulação elétrica. Tais achados foram corroborados pelo aumento da expressão da SERCA2a e do PLB no grupo HU.

Na literatura, estudos apontam que em animais ectodérmicos a contribuição dos estoques intracelulares de Ca^{2+} do RS para ativação contrátil é expressivamente menor do que nos cardiomiócitos dos endotérmicos (SHIELS et al., 2006; VORNANEN, 1999; HAVERINEN & VORNANEN, 2009). O NCX é o principal componente no efluxo de Ca^{2+} na maioria dos ectotérmicos (VORNANEN, 1999). Porém, em mamíferos superiores, incluindo o miocárdio humano, o efluxo de Ca^{2+} é facilitado majoritariamente pela SERCA (70-80%) e, em menor quantidade, pelo NCX (20-30%) (FRANK et al., 2003). O trocador NCX foi o mais expresso entre as proteínas analisadas no grupo HU-308, fundamentando sua importância na função cardíaca em teleostes. No entanto, o aumento de expressão de SERCA2a e PLB, destacam a funcionalidade do RS como fonte de Ca^{2+} ativador do aparato contrátil de *Brycon amazonicus*.

A contribuição do RS na geração da contração dos cardiomiócitos varia entre as espécies, principalmente em peixes (BERS, 2002; VORNANEN et al., 2002; HAVERINEN & VORNANEN, 2009). A SERCA2a e PLB são proteínas essenciais no sequestro de Ca^{2+} de para o RS mantendo as reservas intracelulares elevadas deste íon, o que promove uma maior disponibilidade de Ca^{2+} a cada batimento. A modulação positiva da atividade da SERCA2a e do PLB pela ativação do receptor CB2 e o consequente aumento da razão PLB/SERCA2a pode resultar em melhoria na ciclagem de Ca^{2+} e favorecer o desempenho contrátil. O RS desempenha um papel fundamental no ciclo de contração e relaxamento em virtude de sua capacidade de regular rigidamente a concentração intracelular de Ca^{2+} (FREDERSDORF et al., 2012). Salienta-se que, as proteínas PLB observadas na membrana de WB, podem estar fosforiladas ou não, pois o anticorpo utilizado na técnica identifica os dois estados da PLB.

Após a inibição do RS pela rianodina, a concentração de Ca^{2+} intracelular

disponível para a ativação do AE-C, foi capaz de manter constante a Fc em quase todas as frequências de estimulação e em ambos os grupos experimentais. Isso evidencia uma importante contribuição do NCX no miocárdio ventricular de matrinxã tanto para o influxo de Ca^{2+} (modo reverso) como para o efluxo (modo normal), uma vez que, com o RS bloqueado, a amplitude do Ca^{2+} transiente é governada pelos canais LTCC e pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Segundo Vornanen (1999), o NCX pode atuar em modo reverso no miocárdio de peixes, contribuindo para o influxo de Ca^{2+} ativador nos cardiomiócitos.

Nota-se nas membranas de WB, que duas isoformas de NCX foram expressas e detectadas pela técnica no grupo tratado com o agonista HU-308. Em estudos genômicos de caráter filogenético, Marshall et al. (2005) identificaram três genes de trocadores NCX para a expressão de diferentes isoformas em peixes, entretanto não foi elucidado suas funcionalidades e seus locais de expressão. O NCX1 possui uma distribuição abrangente nos tecidos, incluindo o tecido cardíaco, a musculatura lisa e esquelética (QUEDNAU et al., 1997), enquanto que os trocadores NCX2 e NCX3 são majoritariamente encontrados no cérebro e na musculatura esquelética (LI et al., 1994; NICOLL et al., 1996). Blaustien & Lederer (1999) relataram em seu estudo com os trocadores NCX, que a estrutura gênica do NCX1 é quase idêntica entre os grupos ectotérmicos e endotérmicos. Contudo, Schulze et al. (1996) constataram que durante a transcrição do gene, o NCX1 pode sofrer *splicing* alternativo e resultar na expressão de até 32 isoformas distintas.

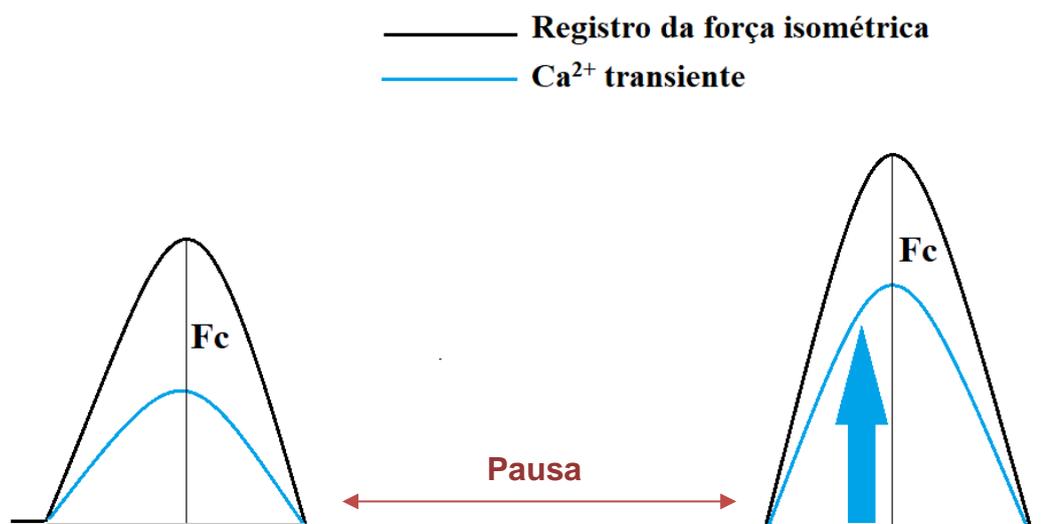
Ainda no que diz respeito à expressão da proteína NCX1 e as diferentes bandas observadas no grupo HU é necessário pontuar que diferentes padrões de glicosilação ou demais alterações pós-transcricionais podem ser as responsáveis pela membrana obtida (KHANANSHVILI, 2017) o que sugere que, caso a ativação do CB2 não exerça um papel na expressão das variantes de NCX, talvez sua modulação acarrete em mudanças no padrão estrutural da mesma, podendo interferir na sua função.

Adicionalmente, a elevada CBC do grupo exposto ao HU tratado com rianodina (HU+RIAN), em comparação ao Ct+RIAN, indica um papel proeminente do NCX após a ativação dos receptores CB2, corroborando com o aumento significativo da expressão dessa proteína no grupo HU.

O protocolo pós-pausa no grupo HU revela o papel proeminente do trocador NCX na extrusão de Ca^{2+} , pois, nas pausas curtas não houve tempo suficiente de um

sequestro significativo de Ca^{2+} pelo RS para proporcionar uma potenciação pós-pausa, o qual foi extrusado para fora da célula pelo NCX, cuja expressão foi elevado nesse grupo. O RS tende a aumentar o sequestro de Ca^{2+} com o prolongamento da pausa diastólica e, conseqüentemente, aumentar a liberação de Ca^{2+} , gerando assim, o aumento da Fc na próxima contração (BOCALINI et al., 2012). Apenas na pausa diastólica de 5 min (não fisiológica), o RS proporcionou uma potenciação da Fc, indicando que o aumento da expressão do trocador NCX fez com que, durante o repouso, o efluxo de Ca^{2+} fosse suficientemente elevado, a ponto de reduzir a disponibilidade de Ca^{2+} para seu armazenamento pelo RS.

Figura 13. Esquema da potenciação da força de contração isométrica (Fc) no protocolo pós-pausa. O aumento significativo da amplitude de Ca^{2+} transiente na primeira contração da tira ventricular, após as pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300s em relação ao registro anterior à pausa, desencadeia o evento de potenciação da Fc.

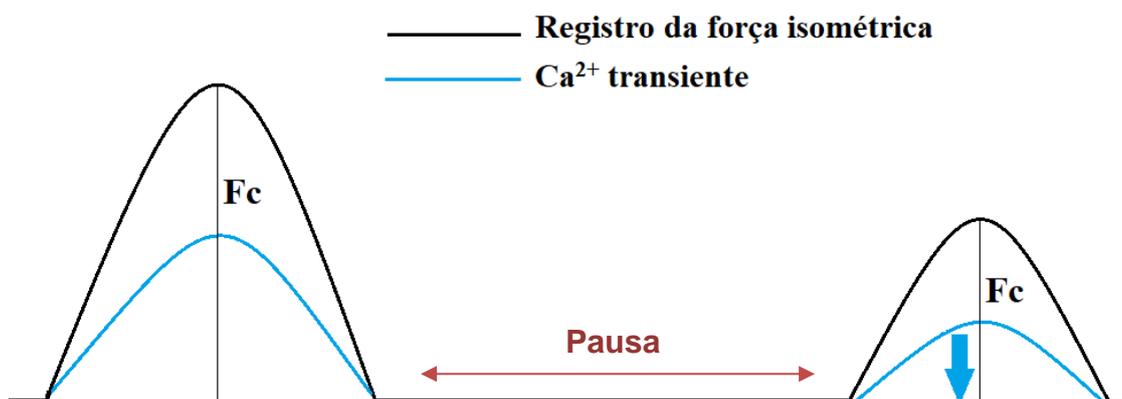


Fonte: Figura do autor

No grupo Ct, a capacidade do RS em estocar Ca^{2+} promoveu os eventos de potenciação da Fc após todas as pausas na estimulação elétrica. A presença de rianodina aboliu essa potenciação em todos os períodos de pausa. Portanto, a abolição da potenciação pós-pausa pela rianodina, indica o papel predominante do RS na ocorrência desse fenômeno (BERS, 1985). Por outro lado, a presença do alcalóide desencadeou o evento de decaimento da Fc pós-pausa (Figura 14) nas tiras ventriculares do grupo HU. Tais resultados reforçam a ineficiência do RS em estocar Ca^{2+} diante da elevada extrusão do íon pelo NCX, altamente expresso, o que reduz a

amplitude do Ca^{2+} transiente na primeira estimulação elétrica após as pausas. Adicionalmente, a contribuição relativa do NCX no efluxo de Ca^{2+} é significativamente maior em cardiomiócitos de peixes (VORNANEN, 1999). Em estudo com bagre-africano (*Clarias gariepinus*) o tratamento de tiras ventriculares na presença de rianodina, também casou um decaimento pós-pausa da Fc (MONTEIRO et al., 2021), assim como em nossos resultados, a ocorrência desse evento foi atribuído a perda gradual de Ca^{2+} pela atividade proeminente dos trocadores NCX.

Figura 14. Esquema do decaimento da força de contração isométrica (Fc) no protocolo pós-pausa. A diminuição significativa da amplitude de Ca^{2+} transiente na primeira contração da tira ventricular, após as pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300s em relação ao registro anterior à pausa, desencadeia o evento do decaimento da Fc.



Fonte: Figura do autor

Em contraste, quando tratadas com Li^+ , tanto as tiras ventriculares do grupo Ct quanto do HU, apresentaram uma potenciação da Fc pós-pausa em todos os tempos de repouso, indicando que RS é funcional em ambos os grupos. Entretanto, as potenciações foram menores no grupo HU, devido a maior expressão e contribuição do NCX. Uma vez inibidos, os trocadores NCX não atuam na remoção de Ca^{2+} , conseqüentemente o RS aumenta o sequestro de Ca^{2+} , pois houve uma redução na competição entre essas vias (SERCA versus NCX) de remoção de Ca^{2+} transiente (HOLUBARSCH, 2002). Com os estoques intracelulares potencialmente elevados, a primeira contração pós-pausa foi potencialmente maior que as anteriores ao repouso, desencadeando o evento de potenciação pós-pausa. O aumento da razão NCX/SERCA no grupo HU sugere que a diminuição do nível citosólico de Ca^{2+} se deve principalmente à extrusão do mesmo para o meio extracelular em detrimento ao seu

armazenamento em estoques intracelulares como no RS (HADRI & HAJJAR, 2011).

Desse modo, nossos resultados apontam para a interação competitiva entre as proteínas NCX e SERCA, evidenciando uma modulação na dinâmica de Ca^{2+} transiente pela ativação dos receptores CB2. Quando o efluxo de Ca^{2+} é majoritariamente realizado pelos trocadores NCX, há uma diminuição na estocagem de Ca^{2+} no RS, portanto reduz a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (BOCALINI et al., 2012; BASSANI, 1994). Deste modo, os valores de Fc e CBC iam ser semelhantes ou inferiores ao Ct, após a adição de Li^+ . Assim, o RS é também importante no AE-C de matrinxã e o aumento na expressão de ambos, NCX e SERCA, pela ativação dos receptores CB2, promoveu uma maior eficiência no manejo de Ca^{2+} durante o AE-C.

6 CONCLUSÕES

A ativação dos receptores CB2 foi capaz de modular positivamente o AE-C do miocárdio ventricular de matrinxã, usado como modelo experimental, por induzir efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos e promover a *up regulation* da expressão das proteínas responsáveis pelo manejo de Ca^{2+} transiente (SERCA2a, PLB, NCX1). Essas alterações melhoraram a capacidade do bombeamento cardíaco promovendo alta eficiência na dinâmica de ciclagem do Ca^{2+} intracelular, batimento a batimento. Os resultados sugerem que a ativação dos receptores CB2 pode levar a regulação de disfunções contráteis cardíacas, demonstrando o potencial desses receptores como alvos na aplicação em terapias cardiovasculares. Os efeitos benéficos observados nesse estudo na contratilidade miocárdica, oferece oportunidades para novas aplicações. Entretanto, a interação entre os CB2 e as respectivas vias de sinalização intracelular envolvidas em seus efeitos, ainda precisam ser elucidadas em estudos futuros e utilizando outros modelos experimentais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, D. G., KENTISH, J. C. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. **J Mol Cell Cardiol**, v. 17, p. 821-840, 1985.
- AVMA - AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **Guidelines for the Euthanasia of Animals**. 2013 Edi.
- BAILEY, J. R.; DRIEDZIC, W. R. Enhanced maximum frequency and force development of fish hearts following temperature acclimatation. **J. Exp. Biol.**, v.

- 149, p. 239-254, 1990.
- BASSANI, J. W. M., et al. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **Journal of Physiology**, v. 476.2, p. 279-293, 1994.
- BERGAMASCHI, M. M. et al. Safety and side effects of cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent. **Current Drug Safety**, v. 6, p. 237-249, 2011.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 6. ed. [s.l.]: Elsevier Ltd, 2010.
- BERS, D.M., Ca²⁺ influx and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in cardiac muscle activation during post-rest recovery. **Am. J. Physiol.** 248, p. 366-381, 1985.
- BLAUSTEIN, M P., LEDERER, W. J. Sodium/calcium exchanger: Its physiological implications. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 763-854, 1999.
- BOCALINI, D.S., et al. Myocardial remodeling after large infarcts in rat converts post rest-potential in force decay. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 98, p. 243–251, 2012.
- BONZ, A.; LASER, M.; KULLMER, S. et al. Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 41, p. 657-664, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CONN, P.M.; RANTIN, F.T. Ethical research as the target of animal extremism: an international problem. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 2, p. 124-126, 2010.
- CUNHA, P.; ROMÃO, A.M.; MASCARENHAS-MELO, F. et al. Endocannabinoid system in cardiovascular disorders - new pharmacotherapeutic opportunities. **J. Pharm. Bioallied. Sci.**, v. 3, n. 3, p. 350-360, 2011.
- DEFER, N.; WAN, J.; SOUKTANI, R. et al. The cannabinoid receptor type 2 promotes cardiac myocyte and fibroblast survival and protects against ischemia/reperfusion-induced cardiomyopathy. **FASEB J.**, v.23, n. 7, p. 2120-2130, 2009.
- DHOPESHWARKAR, A.; MACKIE, K. CB 2 Cannabinoid Receptors as a Therapeutic Target - What Does the Future Hold? **Molecular Pharmacology**, p. 430–437, 2014.
- Di MARZO, V.; PISCITELLI, F. The endocannabinoid system and its modulation by phytocannabinoids. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 692-698, 2015.

- Di MARZO, V.; PISCITELLI, F. The endocannabinoid system and its modulation by phytocannabinoids. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 692-698, 2015.
- DUERR, G. D. et al. "The endocannabinoid-CB2 receptor axis protects the ischemic heart at the early stage of cardiomyopathy." **Basic research in cardiology** v. 109, p. 425, 2014.
- DUFF, G., et al. Cannabinoid receptor CB₂ modulates axon guidance. **Plos One**, v. 8, e70849, 2013.
- FELICIANO, Edwin; ANAYA, Mendivil; ARIZA, Sierra. Sistema endocanabinoide: modificando los factores de riesgo cardiovascular. **Rev Fac Med Unive Nac Colomb**, v. 54, n. 4, p. 269–282, 2006.
- FRANK, K.F., et al. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. **Cardiovasc. Res.**, v. 57, p. 20–27, 2003.
- FREDERSDORF, S.; THUMANN, C.; ZIMMERMANN, W.H. et al. Increased myocardial SERCA expression in early type 2 diabetes mellitus is insulin dependent: In vivo and in vitro data. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 11, p. 57, 2012.
- GHIGO, A., et al. PI3K and calcium signaling in cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 121, p. 282–292, 2017.
- GONZÁLEZ, C.; HERRADÓN, E.; ABALO, R. et al. Cannabinoid/agonist WIN 55,212-2 reduces cardiac ischaemia–reperfusion injury in Zucker diabetic fatty rats: role of CB2 receptors and iNOS/eNOS. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 27, n. 4, p. 331–340, 2011.
- GOULDING, M. The fishes and the forest. **Explorations in Amazonian Natural History**. University of California Press. Berkeley, USA. p. 280, 1980.
- HADRI, L.; HAJJAR, R.J. Calcium cycling proteins and their association with heart failure. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 90, p. 620-624, 2011.
- HAN, D. *et al.* Activation of cannabinoid receptor type II by AM1241 protects adipose-derived mesenchymal stem cells from oxidative damage and enhances their therapeutic efficacy in myocardial infarction mice via Stat3 activation. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 64853–64866, 2017.
- HANLEY, P. J.; TER KEURS, H. E. D. J.; CANNELL, M. B. Excitation-contraction coupling in the heart and the negative inotropic action of volatile anesthetics. **Anesthesiology**, v. 101, p. 999–1014, 2004.
- HAVERINEN, J., VORNANEM, M. Responses of action potential and K⁺ currents to

- temperature acclimation in fish hearts: phylogeny or thermal preferences? **Physiol Biochem Zool.**, v. 82, n. 5, p. 468-482. 2009.
- HOLUBARSCH, C.J.F., Mechanics and energetics of the myocardium. **Springer**, US, 2002
- HOVE-MADSEN, L. et al. Na⁺/ Ca²⁺-exchange activity regulates contraction and SR Ca²⁺ content in rainbow trout atrial myocytes. **Am. J. Physiology**, v. 279, p. 1856–1864, 2000.
- IBRAHIM, B.M.; ABDEL-RAHMAN, A.A. Cannabinoid receptor 1 signaling in cardiovascular regulating nuclei in the brainstem: a review. **J. Adv. Res.**, v. 5, p. 137-145, 2014.
- IZEL, A. C. U., PERIN, R.; MELO, L. A. S. Desempenho de matrinxã (*Brycon cephalus*) submetidos a dietas com diferentes níveis proteicos na Amazônia Central. **Anais da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Fortaleza. p. 258-259, 1996.
- KASCHIMA, E. Cannabinoid CB1/CB2 receptors in the heart: expression, regulation, and function. **Cannabinoids in Health and Disease**, p. 169-185, 2016.
- KHANANSHVILI, D. Structure-dynamic coupling through Ca²⁺-binding regulatory domains of mammalian NCX isoform/splice variants. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 981, p. 41–58, 2017.
- KHO, C., et al., Refiling intracellular calcium stores. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 7, n. 2, 2010.
- KUBO, H., et al. Patients With End-Stage Congestive Heart Failure Treated With β -Adrenergic Receptor Antagonists Have Improved Ventricular Myocyte Calcium Regulatory Protein Abundance. **Circulation**, v. 104, p. 1012-1018, 2001.
- LAYLAND, J., et al. The length dependence of work production in rat papillary-muscles in vitro. **J Exp Biol**, v. 198, p. 2491–2499, 1995.
- LEÓN, O. J. et al. Cardiovascular effects due to the use of cannabinoids. **Revista Colombiana de Cardiologia**, v. 25, n. 3, p. 230–235, 2018.
- LI, Q. et al. Anandamide reduces intracellular Ca²⁺ concentration through suppression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger current in rat cardiac myocytes. **Plos One**, v. 8, 2013.
- LI, Z. M. et al. Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na⁺ - Ca²⁺ exchanger. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 17434-17439, 1994.
- LIU, X. et al. Pharmacological activation of CB2 receptor protects against

- ethanol-induced myocardial injury related to RIP1/RIP3/ MLKL-mediated necroptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.474, p. 1-14, 2020.
- MALFITANO, A. M., et al. What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2). **Semin. Immunol.**, v. 26, p. 369-379, 2014.
- MARSHALL, C. R. et al. Phylogeny of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) genes from genomic data identifies new gene duplications and a new family member in fish species. **Physiological Genomics**, v. 21, n. 2, p. 161–173, 2005.
- MASLOV, L. N., et al. Prospects for creation of cardioprotective drugs based on cannabinoid receptor agonists. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 21, p. 262-272, 2016.
- MATIKAINEN, N.; VORNANEN, M. Effect of season and temperature acclimation on the function of crucian carp (*Carassius carassius*) heart. **J. Exp. Biol.**, v. 167, p. 203–220, 1992.
- MONTECUCCO, F. et al. CB(2) cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 46, p. 612 - 620, 2009.
- MONTECUCCO, F.; DI MARZO, V. At the heart of the matter: The endocannabinoid system in cardiovascular function and dysfunction. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 6, p. 331-340, 2012.
- MONTEIRO, D. A. *et al.* Impact of waterborne and trophic mercury exposures on cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish *Brycon amazonicus* and *Hoplias malabaricus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 201, p. 26–34, 2017.
- MONTEIRO, D. A., et al. Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein from *Rhinocerophis alternatus* snake venom promotes positive inotropism and chronotropism in fish heart. **Toxicon.**, v. 110, p. 1–11, 2016.
- MONTEIRO, D.A., et al. Cardiac contractility of the African sharp-tooth catfish, *Clarias gariepinus*: role of extracellular Ca²⁺, sarcoplasmic reticulum, and β-adrenergic stimulation. **Fish Physiol Biochem**, v.47, p. 1969–1982, 2021.
- NICOLL, D. A. et al. Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 24914-24921, 1996.
- ON, C. et al. Gene structure evolution of the Na⁺- Ca²⁺ exchanger (NCX) family. **BMC Evolution Biol.**, v. 8, p. 127, 2008.

- OPBERGEN, C. J. M., DELMAR, M., VEEN, T. A. B. Potential new mechanisms of pro-arrhythmia in arrhythmogenic cardiomyopathy: focus on calcium sensitive pathways. **Neth Heart J.**, v. 25, p. 157–169, 2017.
- PACHER, P.; BATKAI, S.; KUNOS, G. Blood pressure regulation by endocannabinoids and their receptors. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 1130-1138, 2005a.
- PACHER, P.; BATKAI, S.; OSEI-HYIAMAN, D. et al. Hemodynamic profile, responsiveness to anandamide, and baroreflex sensitivity of mice lacking fatty acid amide hydrolase. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 289, p. H533-H541, 2005b.
- PEGORARO, C.; POLLET, N.; MONSORO-BRUG, A. H. Tissue-specific expression of Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases (ATP2A/SERCA) 1, 2, 3 during *Xenopus laevis* development. **Gene Expression Patterns**, v. 11, p. 122-128, 2011.
- PERTWEE, R. G. Cannabinoid pharmacology: The first 66 years. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. SUPPL. 1, 2006.
- QUEDNAU, B. D., NICOLL, D. A., PHILIPSON, K. D. Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. C1250– 1261, 1997.
- RANTIN, F. T.; KALININ, A. L.; MONTEIRO, D. A. **Chapter 9 - The cardiovascular system**. São Carlos: Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish, 2020. v. 3.
- RISSOLI, R.Z., et al. Effects of exercise training on excitation-contraction coupling, calcium dynamics and protein expression in the heart of the Neotropical fish *Brycon amazonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part. A**, v. 214, p. 85-93, 2017.
- RIVAROLI, L. RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish: Curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae) and trahira, *Hoplias malabaricus* (Teleostei: Erythrinidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 145A, p. 322-327, 2006.
- ROUSSEAU, E. ; SMITH, J. S.; MEISSNER, G. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca²⁺ release channels. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p. C364-C368, 1987.
- SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Exploração farmacológica do sistema

- endocannabinolde: Novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. SUPPL. 1, p. 7–14, 2010.
- SAROTT, R.C., et al. Optical control of cannabinoid receptor 2 mediated Ca^{2+} release enabled by synthesis of photoswitchable probes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 143, p. 736-743, 2021.
- SCHULZE, D. H. et al. Alternative splicing of the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger gene, NCX1. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 779, p. 46-57, 1996.
- SHIELS, H. A. et al. The sarcoplasmic reticulum plays a major role in isometric contraction in atrial muscle of yellowfin tuna. **Journal of Experimental Biology**, v. 202, n. 7, p. 881-890, 1999.
- SHIELS, H. A., et al. Sarcolemmal ion currents and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in ventricular myocytes from the cold stenothermic fish, the burbot (*Lota lota*). **J. Exp. Biol.**, v. 209, p. 3091-3100, 2006.
- SHIELS, H. A., FARREL A. The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing Ca^{2+} to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. **J Exp Biol.**, v. 200, p. 1607-1621, 1997.
- SHIELS, H.A., et al. The force-frequency relationship in fish hearts e a review. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.132A, p. 811-826, 2002.
- SILVESTRO, S. et al. Use of Cannabidiol in the treatment of epilepsy: Efficacy and security in clinical trials. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1459, 2019.
- SIMMERMAN, H. K.; JONES, L. P. Phospholamban: protein structure, mechanism of action and role in cardiac function. **Physiol. Ver.**, v. 78, p. 921-947, 1998.
- SOLBRIG, M.V.; FAN, Y.; HAZELTON, P. Prospects for cannabinoid therapies in viral encephalitis. **Brain Research**, v. 1537, p. 273–282, 2013.
- STEFFENS, S.; PACHER, P. Targeting cannabinoid receptor CB2 in cardiovascular disorders: Promises and controversies. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 2, p. 313–323, 2012.
- STERIN-BORDA, S.; ZAR, C.F.D.; BORDA, E. Differential CB1 and CB2 cannabinoid receptor-inotropic response of rat isolated atria: Endogenous signal transduction pathways. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, p. 1705-1713, 2005.
- THOMAS, M. J.; HAMMAN, B.; TIBBITS, G. F. Dihydropyridine and ryanodine binding

- in ventricles from rat, dogfish and hagfish. **J. Exp. Biol.**, v. 199, p. 1999-2009, 1996.
- TIBBITS, G. F.; MOYES, C. D.; HOVE-MADSEN, L. Excitation-contraction coupling in the teleost heart. **Fish Physiology: The Cardiovascular System**, v. 12A, p. 267-303, 1992.
- TORTOLERO, S. A. R. *et al.* Efeito da densidade de estocagem no crescimento do matrinxã, *Brycon amazonicus* em gaiolas de pequeno volume. **Revista Brasileira de engenharia de Pesca**, v. 5, n. 1, p. 81–92, 2010.
- VAL, A. L., HONCZARIK, A. **Criando peixes na amazônia**. Manaus, AM: Editora do INPA, p. 160, 1995.
- VORNANEM, M. Na⁺/Ca²⁺ exchange current in ventricular myocytes of fish heart: contribution to sarcolemmal Ca²⁺ influx. **J. Exp. Biol.**, v. 202, p.1763-1775, 1999.
- VORNANEN, M., *et al.* Plasticity of excitation–contraction coupling in fish cardiac myocytes. **Comp. Biochem Physiol A**, v. 132, p. 827–846, 2002.
- WANG, P.F. *et al.* Cannabinoid-2 receptor activation protects against infarct and ischemia-reperfusion heart injury. **Cardiovasc. Pharmacol**, v. 59, n. 4, p. 301–307, 2012.
- WANG, Y.; MA, S.; WANG, Q. *et al.* Effects of cannabinoid receptor type 2 on endogenous myocardial regeneration by activating cardiac progenitor cells in mouse infarcted heart. **Sci China Life Sci.**, v. 57, p. 201-208, 2014.
- ZORATTI, C., *et al.* Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, p. 1351–1362, 2003.