

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS SÃO CARLOS  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar-UNESP

RAQUEL FERNANDA SALLA

**FUNÇÃO CARDÍACA E METABOLISMO DE MACHOS E FÊMEAS DE**  
***Rhinella icterica* NO PERÍODO REPRODUTIVO**

São Carlos

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS SÃO CARLOS  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar-UNESP

RAQUEL FERNANDA SALLA

**FUNÇÃO CARDÍACA E METABOLISMO DE MACHOS E FÊMEAS DE**  
***Rhinella icterica* NO PERÍODO REPRODUTIVO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas associação ampla UFSCAR/UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ciências Fisiológicas.

**Orientadora:** Profa. Dra. Ana Lucia Kalinin  
**Co-orientadora:** Prof. Dra. Monica Jones Costa

São Carlos

2017





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

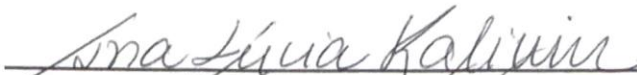
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---


**Folha de Aprovação**

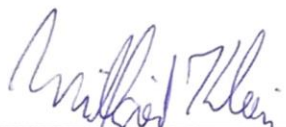
---

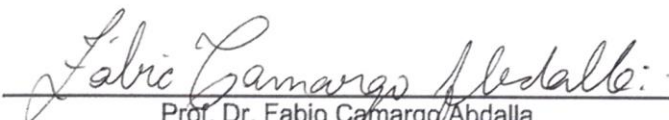
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Raquel Fernanda Salla, realizada em 17/11/2017:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ana Lúcia Kalinin  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. André Luis da Cruz  
UFBA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Classius de Oliveira  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wilfried Klein  
USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fabio Camargo Abdalla  
UFSCar

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese especialmente à minha mãe Dona Suzana e ao meu irmão Rodrigo, por todo o apoio, cuidado e incentivo durante todos os anos do meu doutorado. E à todos aqueles que contribuíram de alguma forma (no laboratório, no dia-a-dia ou simplesmente com uma palavra amiga de incentivo)

## AGRADECIMENTOS

Quero primeiramente demonstrar minha gratidão a Deus pela oportunidade de contemplar essa vida e nela caminhar, aprender e evoluir.

Agradeço à minha querida Anita pela orientação, paciência, compreensão, amizade, e pela oportunidade de aprender cada vez mais. À minha co-orientadora Monica por todo o apoio, amizade, carinho e por todos os ensinamentos durante a minha caminhada científica.

Aos colaboradores deste trabalho: Eliton (saudações corinthianas) e Z, pelas madrugadas de western blotting e pizzas do Carrefour, professor Cleo Leite; Nilmara e Vivian pelos auxílios nos experimentos; professor Luciano Castanho e Cristina Salinas pelas coletas.

Aos amigos: Lilian e Cris pelo companheirismo na vida “sapológica”; Bruno Souza por todo o incentivo; Gisele pela amizade que supera fronteiras; Cynthia e Karina (as melhores mineiras desse mundo) pela amizade, almoços no RU, e por me acolherem na vida São Carlense com tanto carinho (saudades da cachorra mais feliz do mundo: Negs); ao pessoal de Sanca, Carol Angelis, Will, Jorge, Renato, e Catherine (the best gringa friend); aos professores Fabio Abdalla, Elaine, Felipe Toledo, e Cleoni pela amizade e colaboração; à Carol e Joice (minhas flores da Unicamp), Lucas Forti (por poder conhecer os Crossos e pelas cicatrizes eternas dos carrapatos); aos técnicos Fernando e Gustavo; ao Alexandre (o anjo da guarda do PIPGCF); aos amigos das eras geológicas da graduação André Oliveira (o melhor geógrafo do mundo), Lari Rodrigues, Samuca, Ferzinha, Zidane (o cara dos dinossauros), à Roseli (nosso anjo do PPGBMA), aos amigos da Pró-vida, em especial à Dany pela amizade e acolhimento de sempre, Felipe Marquezini pelas correções do meu singelo português, e tantos outros que não caberiam nesta página!

Aos meus pais, pela oportunidade de nascer e crescer com tanto carinho e amor. À Mamis poderosa por todo amor, e incentivo. Aos meus irmãos Rogério e Ronaldo, e especialmente ao Digão por todo o apoio. Aliás, Mãe e Digão já foram até caçar sapos do doutorado comigo!!

Ao meu grande amigo e namorado, Rafael Jacob, por todos os ensinamentos sobre um mundo bem melhor, pelo apoio, paciência, amor, e companheirismo, desde a leitura dos meus artigos em inglês até a companhia na coleta dos sapos no meio do mato e de cavernas!

Por fim, não poderia deixar de agradecer aos Russos (não é necessário especificar), aos inventores do Lindt (melhor chocolate do mundo), aos asiáticos imigrantes (por trazerem sua culinária oriental dos deuses para nós), e aos UFSGansos e UFSCães que sempre nos recebem com tanta alegria, abanando seus rabinhos felizes na Federal! A todos, o meu “muito obrigada”, por proporcionarem momentos mais felizes na minha vida contribuindo, consequentemente, com o cumprimento e sucesso do meu doutorado!

*“Sapo Cururu na beira do rio,  
quando o sapo canta, ó Maninha,  
é porque tem frio.  
A mulher do sapo, é quem está lá dentro  
fazendo rendinha, ó Maninha, para o  
casamento”*

*(Cantiga de domínio popular)*

## RESUMO

Considerando a ausência de estudos acerca da função cardíaca de sexos distintos de anfíbios anuros nativos, o presente estudo se propôs a comparar a frequência cardíaca basal (fh) e a importância e participação das principais proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contracção de cada gênero sexual da espécie *Rhinella icterica*: o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e sua proteína assessória fosfolambano (PLB), e a proteína de membrana  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase. Ademais, foi determinada a taxa metabólica padrão dos animais com o intuito de avaliar se as características cardíacas estão relacionadas ao nível metabólico de cada sexo nessa espécie. Para tanto, foram realizados experimentos *in vitro* com tiras cardíacas ventriculares tratadas com rianodina, que resultou em uma redução significativa da força de contracção, indicando uma relevante participação do retículo sarcoplasmático em ambos sexos de *R. icterica*, porém mais evidente nos machos. O tratamento com LiCl demonstrou uma maior dependência das fêmeas no que diz respeito ao papel do NCX como fonte de cálcio para a contracção, e ainda maior nos mecanismos de relaxamento. O protocolo com ouabaína demonstrou uma importância significativa da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase em ambos sexos, especialmente nos mecanismos de relaxamento. Corroborando estes resultados, a expressão da SERCA e de PLB foi mais elevada nos machos, e o NCX obteve maior expressão nas fêmeas. A taxa metabólica padrão dos machos também foi maior que a das fêmeas, o que indica uma possível relação entre a taxa metabólica de cada sexo e a sua função cardíaca adaptada a cada metabolismo nesta espécie. A função cardíaca, portanto, varia de acordo com o sexo em *R. icterica*, o que representa um dado inédito na fisiologia comparada de anfíbios anuros.

Palavras-chave: sapos-cururu, retículo sarcoplasmático, função cardíaca,



## ABSTRACT

Considering the absence of studies on the cardiac function of distinct sexes of native anuran amphibians, the present study proposed to compare the basal heart rate (fh) and the importance and participation of the main proteins involved in the excitation-contraction coupling of each sex in *Rhinella icterica* species: the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX), the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA), its advisory protein phospholamban (PLB), and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase membrane protein. In addition, the analysis of the basal metabolic rate of the animals verified if the cardiac characteristics are related to the metabolic level of each sex in this species. For this, *in vitro* experiments with ventricular cardiac strips treated with rianodine were performed, which demonstrated a significant reduction of the contraction force, indicating a relevant partitioning of the sarcoplasmic reticulum in both genera of this species, but more evident in males. LiCl treatment demonstrated a greater dependence of females on the role of NCX as a source of calcium for contraction, and even more on relaxation mechanisms. The ouabain protocol demonstrated a significant importance of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in both sexes, especially in the relaxation mechanisms. Corroborating these results, the expression of SERCA and PLB was higher in males, and NCX showed higher expression in females. The analyzes of basal metabolic rate of males also revealed higher values, which indicates a possible relationship between the metabolic rate of each sexual gender and their cardiac function adapted to each metabolism in this species. Cardiac function, therefore, varies according to sex in *R. icterica*, which represents an unprecedented finding in the comparative physiology of anuran amphibians.

Keywords: Cururu toads, sarcoplasmic reticulum, cardiac function

## LISTA DE ABREVIATURAS

Bpm - batimentos por minuto

Canais- L - canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes do tipo "L"

Ctrl - controle

E-C - excitação-contração

FC - força de contração

fh - frequência cardíaca basal

NCX - trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Ouab - ouabaína

PLB – fosfolambano

Rian - rianodina

RS – retículo sarcoplasmático

SERCA -  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático

THR tempo para 50 % do relaxamento

TMB - taxa metabólica padrão

TPT - tempo para o pico de tensão

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Morfologia funcional do coração de um anfíbio anuro.....	5
FIGURA 2- Fotomicrografia eletrônica de miócitos isolados de anfíbios.....	7
FIGURA 3- Morfologia dorsal e lateral de machos e fêmeas de <i>R. icterica</i> .....	15
FIGURA 4 - Montagem do sistema de aquisição do eletrocardiograma.....	17
FIGURA 5 - Posicionamento do anfíbio na câmara experimental.....	18
FIGURA 6 - Sistema completo de aquisição do eletrocardiograma.....	19
FIGURA 7 - Componentes básicos do eletrocardiograma.....	19
FIGURA 8 - Câmara respirométrica.....	20
FIGURA 9 - Set experimental de respirometria de fluxo fechado.....	21
FIGURA 10- Preparação das tiras ventriculares no set experimental.....	23
FIGURA 11 - Set experimental de aquisição <i>in vitro</i> .....	24
FIGURA 12- Registro das contrações ventriculares <i>in vitro</i> de <i>Rhinella icterica</i> .....	25
FIGURA 13 - Registro da aquisição <i>in vitro</i> e os segmentos analisados.....	27
FIGURA 14 - Imagem comparativa entre o ECG padrão de humano e de um indivíduo macho do anfíbio <i>Rhinella icterica</i> .....	30
FIGURA 15- Registros eletrocardiográficos: morfologia e magnitude do ECG de <i>Rhinella icterica</i> .....	31
FIGURA 16 - Valores médios da frequência cardíaca basal de <i>R. icterica</i> .....	32
FIGURA 17 - Gráfico da taxa metabólica padrão desempenhada por machos e fêmeas de <i>R. icterica</i> durante 24 horas de registro a 25 °C.....	33
FIGURA 18 - Efeitos da rianodina sobre a força de contração de tiras ventriculares de <i>R. icterica</i> .....	34
FIGURA 19 - Efeitos da rianodina sobre o tempo para o pico de tensão em tiras ventriculares de <i>R. icterica</i> .....	35
FIGURA 20 - Efeitos da rianodina sobre o tempo para 50% do relaxamento em tiras ventriculares de <i>R. icterica</i> .....	36
FIGURA 21 - Membranas de western blotting e a expressão das proteínas: SERCA, PLB e Actina.....	37
FIGURA 22 - Níveis de expressão das proteínas SERCA e PLB.....	38
FIGURA 23 - Efeitos do LiCl sobre a força de contração de tiras ventriculares de <i>R. icterica</i> .....	39

FIGURA 24 - Efeitos do LiCl sobre o tempo para o pico de tensão de tiras ventriculares de <i>R. icterica</i> .....	41
FIGURA 25 - Efeitos do LiCl sobre o tempo para 50% do relaxamento em tiras ventriculares de <i>R. icterica</i> .....	42
FIGURA 26: Membranas de expressão do trocador NCX.....	43
FIGURA 27 - Níveis de expressão do NCX em <i>R. icterica</i> .....	43
FIGURA 28 - Efeitos da ouabaína sobre a força de contração de tiras ventriculares de <i>R. icterica</i> .....	44
FIGURA 29 - Efeitos da ouabaína sobre o tempo para o pico de tensão em tiras ventriculares de <i>R. icterica</i> .....	45
FIGURA 30 - Efeitos da ouabaína sobre o tempo para 50% do relaxamento em tiras ventriculares de <i>R. icterica</i> .....	46

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resumo dos valores médios obtidos para os segmentos padrão do eletrocardiograma de machos e fêmeas de <i>R. icterica</i> .....	31
---	----

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Contextualização e Justificativa.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. O coração dos anfíbios.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Morfofisiologia dos miócitos ventriculares de anfíbios.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. O acoplamento excitação-contração (E-C) e o relaxamento cardíaco m anfíbios.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5. O eletrocardiograma e a frequência cardíaca dos anfíbios anuros.....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. A espécie de estudo: <i>Rhinella icterica</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Obtenção dos animais e manutenção.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3. Determinação da frequência cardíaca basal <i>in vivo</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Determinação da taxa metabólica padrão.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5. Eutanásia e coleta das amostras.....</b>	<b>21</b>
<b>3.6. Determinação da função cardíaca <i>in vitro</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>3.6.1. Preparação das Tiras Ventriculares.....</b>	<b>22</b>
<b>3.6.2. Protocolos Experimentais.....</b>	<b>24</b>
<b>3.6.2.1. Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequência).....</b>	<b>24</b>
<b>3.6.2.2. Adição de Rianodina.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6.2.3. Substituição da solução fisiológica convencional pela solução com LiCl.....</b>	<b>26</b>
<b>3.6.2.4. Adição de Ouabaína.....</b>	<b>26</b>
<b>3.6.3. Análise dos resultados <i>in vitro</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>3.7. Western blotting.....</b>	<b>28</b>
<b>3.8. Análises Estatísticas.....</b>	<b>29</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Eletrocardiograma: do desenvolvimento da técnica aos registros.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Taxa metabólica padrão.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3. Efeitos da rianodina, e a expressão de SERCA e PLB.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.1. Efeitos da rianodina.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.2. Expressão das proteínas do retículo sarcoplasmático: SERCA e PLB.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4. Efeitos do LiCl, e a expressão de NCX.....</b>	<b>38</b>

4.4.1. Efeitos do LiCl.....	38
4.4.2. Expressão do trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> (NCX).....	42
4.5. Efeitos da ouabaína.....	43
5. DISCUSSÃO.....	46
5.1.1. EGC em anfíbios: desenvolvimento e execução da nova técnica.....	47
5.1.2. Análise dos registros eletrocardiográficos.....	48
5.2. Análises <i>in vivo</i> : frequência cardíaca e taxa metabólica basais.....	52
5.3. Funcionalidade do retículo sarcoplasmático: análises <i>in vitro</i> e moleculares.....	56
5.3.1. Experimentos com Rianodina.....	56
5.3.2. Western blotting e a expressão das proteínas cardíacas: SERCA e PLB.....	59
5.4. Experimentos com LiCl.....	61
5.4.1. Experimentos <i>in vitro</i> : efeitos do LiCl.....	61
5.4.2. Western blotting e a expressão do trocador NCX.....	64
5.5. Experimentos com Ouabaína.....	65
5.6. Considerações finais.....	66
6. CONCLUSÃO.....	68
7. REFERÊNCIAS.....	69

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Contextualização e Justificativa

Os anfíbios apresentam algumas características que se distinguem não somente entre as espécies, mas também entre machos e fêmeas dentro de uma mesma espécie (HOPKINS, 2007). Dentre essas peculiaridades de sexo destacam-se os tamanhos corpóreos, comportamento, ecologia, nível de atividade, além de peculiaridades anatômicas, hormonais e metabólicas, o que faz com que a demanda imposta sobre algumas funções biológicas, em especial a função cardíaca, possa ser bastante variável entre os sexos (LILLYWHITE; ZIPPEL; FARRELL, 1999; HOPKINS, 2007).

Nesse contexto, limitados são os estudos que se dedicaram a elucidar os mecanismos contráteis e a fisiologia cardíaca de anfíbios anuros, não havendo até o momento quaisquer comparações entre os sexos neste sentido (MORAD; ORKAND, 1971; PAGE; NIEDERGERKE, 1972; PELSTER et al., 1993). Dentre o que se sabe, embora muitos mecanismos cardíacos sejam comuns a todos os vertebrados, é possível observar nos anfíbios, e em algumas espécies de peixes e répteis, algumas características em seus miócitos que os distinguem dos demais grupos no que diz respeito à modulação dos íons importantes à contração cardíaca (FORBES; SPERELAKIS, 1971; MUÑOZ-CHÁPULI; HAMLETT, 1996; LILLYWHITE; ZIPPEL; FARRELL, 1999). O sistema de túbulos-T em anfíbios, em outros vertebrados basais, e também nas aves é considerado rudimentar, senão ausente (KEEN; FARREL, 1992; MÖLLER-NIELSEN; GESSER, 1992; DRIEDZIC; GESSER, 1994a; TIBBITS; XU; SEDARAT, 2002). O diâmetro dos miócitos dos anfíbios é bastante reduzido quando comparado ao dos mamíferos (PAGE; NIEDERGERKE, 1972; BOSSEN; SOMMER, 1984; BRANDT et al., 1998; TIBBITS; XU; SEDARAT, 2002). Adicionalmente, as miofibrilas geralmente se concentram nas regiões mais periféricas dos miócitos, o que reduz a distância de difusão dos íons no interior da célula (PEACHEY, 1965; PAGE; NIEDERGERKE, 1972; BOSSEN; SOMMER, 1984; BRANDT et al., 1998; TIBBITS; XU; SEDARAT, 2002). Todas essas características levaram à sugestão de que o retículo sarcoplasmático (RS – organela que estoca e libera cálcio dentro do miócito) não teria um papel de grande relevância na contratilidade cardíaca dos anfíbios (NIEDERGERKE, 1963; PEACHEY, 1965; FORBES; SPERELAKIS, 1971; KAVALER, 1974; TIJSKENS; MEISSNER; FRANZINI-ARMSTRONG, 2003).

De fato, os primeiros trabalhos que investigaram o papel do RS na contração cardíaca de algumas espécies de anfíbios não indicaram grande participação desta organela no



acoplamento excitação-contração, a qual passou a ser considerada rudimentar, ou até mesmo ausente no tecido cardíaco dos anfíbios em geral (NIEDERGERKE, 1963; KAVALER, 1974; ANDERSON; HIRSCH; KAVALER, 1977; NIEDERGERKE; PAGE, 1981; BOSSEN; SOMMER, 1984; TUNSTALL; CHAPMANT, 1994; TIJSKENS; MEISSNER; FRANZINI-ARMSTRONG, 2003), (FORBES; SPERELAKIS, 1971). No entanto, todos esses trabalhos foram realizados com espécies tipicamente europeias ou norte-americanas, adaptadas ao frio intenso do inverno temperado e dotadas de um metabolismo baixo (ST-PIERRE; BRAND; BOUTILIER, 2000; ULTSCH; REESE; STEWART, 2004). Tais características geralmente requerem uma demanda cardíaca relativamente menor, o que explicaria o papel reduzido do RS na contratilidade cardíaca daquelas espécies (BUCHER; RYAN; BARTHOLOMEW, 1982; TAIGEN; POUGH, 1983, 1985).

Em contrapartida, estudos posteriores com *Euphlyctis hexadactylus*, espécie típica de ambientes tropicais e de metabolismo relativamente mais elevado (ALAM et al., 2008), observaram uma forte dependência do RS no que diz respeito às fontes de cálcio para os mecanismos cardíacos dessa espécie (SUBRAMANI; VIJAYANAND; THARION, 2002; SUBRAMANI et al., 2005). O que sugere uma possível correlação entre a taxa metabólica e a participação do retículo sarcoplasmático no acoplamento E-C de algumas espécies de anfíbios.

Nesse sentido, considerando o ambiente tropical brasileiro como provedor de constantes variações diárias e sazonais de temperatura, além de amplas condições climáticas, é válido assumir que algumas espécies nativas de anuros neotropicais possam apresentar demandas metabólicas mais elevadas e, como consequência, possam vir a apresentar adaptações cardíacas adequadas a este ambiente. Ademais, todos estes estudos acerca da fisiologia cardíaca dos anfíbios foram conduzidos indiscriminadamente com machos e fêmeas, de modo que até o momento não há comparações entre os sexos. Assim, considerando-se a argumentação precedente e a ausência de estudos fisiológicos comparados com sexos distintos de anuros brasileiras, o objetivo do presente estudo consistiu em avaliar e comparar os níveis metabólicos e a função cardíaca de machos e fêmeas de *Rhinella icterica*. A escolha por essa espécie deve-se à sua ampla distribuição territorial, além de possuir uma população estável na natureza.

Para tanto, foram feitas análises da taxa metabólica padrão, da frequência cardíaca basal, experimentos de contratilidade cardíaca *in vitro* e da expressão de proteínas cardíacas.

Este estudo representa uma fonte inédita do conhecimento da fisiologia cardíaca comparada entre sexos distintos de uma mesma espécie de anuro. Além disso, o estudo e o conhecimento de espécies nativas é imprescindível quando se objetiva utilizar ferramentas efetivamente preditivas e úteis para a proteção e monitoramento dos ambientes (TOLEDO; BATISTA, 2012; VERDADE et al., 2012). Aprofundando-se o conhecimento fisiológico acerca da fauna brasileira poderão ser elaboradas propostas mais adequadas e eficazes para o monitoramento e a proteção dos organismos em seus ambientes. Adicionalmente, os estudos fisiológicos permitem identificar possíveis estratégias adaptativas e/ou evolutivas determinantes para a história natural e a sobrevivência dos anfíbios nos ambientes tropicais.

## **1.2. A espécie de estudo: *Rhinella icterica***

A família dos *Bufonidae* possui atualmente cerca 600 espécies de anfíbios anuros catalogados pelo mundo (FROST, 2017). De interesse especial para esta pesquisa, destaca-se a *Rhinella icterica* (Spix, 1824), ou o “Sapo Cururu Amarelo”, como popularmente conhecido. Devido à sua tolerância a diversos habitats, essa espécie apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em regiões de Mata Atlântica, na América do Sul, desde a porção leste do Paraguai, Argentina, e Brasil (desde o Rio grande Sul até o sul da Bahia e de Goiás) (SILVANO et al., 2010; SABAGH; CARVALHO-E-SILVA; ROCHA, 2012; FROST, 2017).

De hábitos bastante variados, os cururus podem ser encontradas desde florestas até mesmo em áreas abertas de cerrado. Suas desovas ocorrem em riachos, correntes ou poças, que podem ser permanentes, ou temporárias (SILVANO et al., 2010). Bastante adaptada aos ambientes antrópicos, essa espécie pode ser encontrada atualmente até mesmo nas cidades, próximas a regiões de córregos ou lagoas (SILVANO et al., 2010).

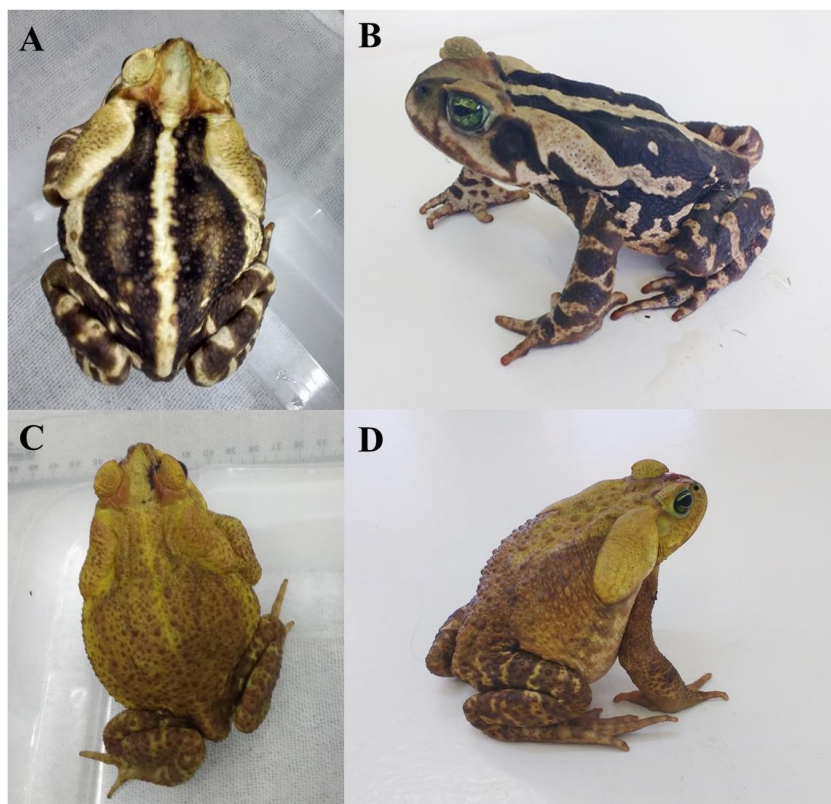
As fêmeas são maiores e possuem uma coloração de fundo amarelo claro, com manchas bastante escuras (marrom a preto) nas regiões dorsal, ventral, e nas patas (Figura 3A, e 3B). Os machos, por sua vez, são relativamente menores, e possuem uma coloração amarelada (às vezes, um pouco esverdeada), com manchas mais escuras nas pernas (Figura 3C e 3D) (KWET; DI-BERNARDO; MANEYRO, 2006; ARANTES et al., 2015).

Outro critério utilizado para a identificação desta espécie são os padrões de canto, cujas características são únicas da espécie (FORTI, 2009). Para uma identificação mais detalhada, características morfológicas específicas podem ser avaliadas, como por exemplo, a

presença das glândulas paratíoides subtriangulares bem desenvolvidas, a relação entre o diâmetro do tímpano e do olho geralmente é maior que 0.4, e a ausência de glândulas tibiais (KWET; DI-BERNARDO; MANEYRO, 2006).

Tendo em vista sua ampla distribuição, a tolerância a diversos habitats, e uma população grande e estável (SILVANO et al., 2010), essa espécie pode atuar como um ótimo modelo neotropical e um bioindicador para estudos de monitoramento ambiental. Entretanto, até o momento, a grande maioria dos trabalhos realizados com *R. icterica* consistem essencialmente em dados de distribuição da espécie (LIMA et al., 2010; CERON; LUCAS, 2017), hábitos alimentares (SABAGH; CARVALHO-E-SILVA, 2008; FORTI, 2009; SABAGH; CARVALHO-E-SILVA; ROCHA, 2012; SOLÉ et al., 2017) ou sobre a estrutura das comunidades de seus parasitas (YODER; COGGINS, 2007; PINHÃO, R; WUNDERLICH, A.C.; ANJOS, L.A.; SILVA, 2009; DOS SANTOS; AMATO; BORGES-MARTINS, 2013). Assim, escassos são os estudos acerca da sua biologia e fisiologia, o que faz ainda mais necessária a realização de novos estudos neste sentido.

**FIGURA 3 - Morfologia dorsal e lateral de machos e fêmeas de *R. icterica*.**



**A** - Vista dorsal de uma fêmea de *R. icterica*. **B** – Vista lateral de uma fêmea de *R. icterica*. **C** - Vista dorsal de um macho que *R. icterica*. **D** – Vista lateral de um macho que *R. icterica*. Notar padrões de coloração bastante distintos.

### 1.3. O coração dos anfíbios

A classe Amphibia inclui todos os anfíbios modernos e abrange atualmente 7.728 espécies identificadas (FROST, 2017). Divididos em 3 grandes ordens, os anfíbios são classificados em Caudata, que compreende as salamandras e tritões (717 sp.); Gymnophiona, que inclui as cecílias e cobras cegas (207 sp.); e Anura, a ordem mais numerosa, com 6.807 espécies, e que é representada pelos sapos, rãs e pererecas (FROST, 2017). De grande importância ambiental e ecológica, os anuros apresentam uma enorme variedade de adaptações fisiológicas, dentre as quais destaca-se a função cardíaca, que será tratada ao longo desta tese.

Os anfíbios divergiram significativamente durante o período Carbonífero por volta de 350 milhões de anos atrás (SCHOCH, 2014), e demonstram muitas similaridades em sua estrutura cardíaca com os peixes pulmonados (BURGGREN; FARRELL; LILLYWHITE, 2011). Nos anfíbios mais basais, como por exemplo as salamandras não pulmonadas (ex: Família *Plethodontidae*, Ordem *Caudata*), o átrio é parcialmente separado. Na maioria das outras espécies e em todos os anuros, o átrio é completamente septado, resultando na evolução de um coração com três câmaras definidas (dois átrios e um ventrículo), que recebe sangue dos pulmões e da circulação venosa sistêmica (BURGGREN; FARRELL; LILLYWHITE, 2011).

De modo semelhante aos peixes pulmonados, as regiões correspondentes ao seio venoso, ao cone arterioso e às veias pulmonares são as mesmas, e não existe um septo interventricular (HOLMES, 1975). O ventrículo único é composto de um tecido miocárdico trabeculado com cristas internas (BURGGREN; FARRELL; LILLYWHITE, 2011; BETTEX; PRÊTRE; CHASSOT, 2014). Essas cristas são responsáveis por reduzir a mistura do sangue oxigenado com o venoso, e auxiliam no direcionamento do fluxo de sangue para o circuito pulmonar ou sistêmico (BETTEX; PRÊTRE; CHASSOT, 2014).

O sangue ejetado do coração passa através das válvulas de cúspides semilunares em direção ao cone arterioso que contém uma válvula espiral relativamente complexa. Essa válvula espiral (de modo semelhante ao que ocorre nos peixes dipnoicos) separam as correntes de sangue oxigenado ou desoxigenado ao longo do cone arterioso, o qual termina com outro grupo de válvulas de cúspides semilunares. Dessa forma, o sangue desoxigenado é carregado preferencialmente pelas artérias que transportam sangue para os pulmões (e pele, no caso dos anuros), enquanto o sangue oxigenado é canalizado preferencialmente para as artérias sistêmicas (FARRELL; COLUMBIA, 2001; BURGGREN; FARRELL; LILLYWHITE, 2011). A figura 1 apresenta a anatomia padrão do coração de um

anfíbio anuro. Após o período de metamorfose, os anfíbios em sua fase adulta não mais apresentam brânquias, portanto, os arcos aórticos se separam em capilares para a troca dos gases (HOLMES, 1975; BURGGREN; FARRELL; LILLYWHITE, 2011). A aorta ventral é dividida internamente em duas vias principais. Uma via contendo os vasos sanguíneos que partem da artéria pulmonar, a qual surge do sexto arco aórtico, e todos os outros vasos sanguíneos sistêmicos que são desviados para os outros arcos. A segunda via é composta pelo arco aórtico, cuja origem provém de outros arcos que se modificaram através da evolução resultando na junção das aortas ventral e dorsal pelo quarto arco aórtico (HOLMES, 1975).

Os pulmões dos anfíbios não são capazes de suprir todo o requerimento de oxigênio do organismo, dessa forma, outros caminhos para aquisição de oxigênio também são necessários (WITHERS et al., 2014). As artérias pulmonares dos anuros representam uma dessas vias alternativas, desviando 25% do débito cardíaco para a pele por meio de capilares. Por possuir uma pele bastante delgada e altamente vascularizada, o oxigênio se difunde através da pele, alcançando as vias sanguíneas (BURGGREN; MOALLF, 1984). Ao longo do retorno pulmonar, este sangue então é 96% saturado com oxigênio (JØRGENSEN, 2000; WITHERS et al., 2014). Apesar dos anuros possuírem tal habilidade de respirar pela pele, a maior parte da respiração ocorre através dos pulmões (JØRGENSEN, 2000). Outras vias alternativas ocorrem em espécies que necessitam de adaptações fisiológicas específicas, como os anuros que estivam, ou aqueles que mergulham, entre outros (BURGGREN; MOALLF, 1984).

**FIGURA 1 - Morfologia funcional do coração de um anfíbio anuro.**

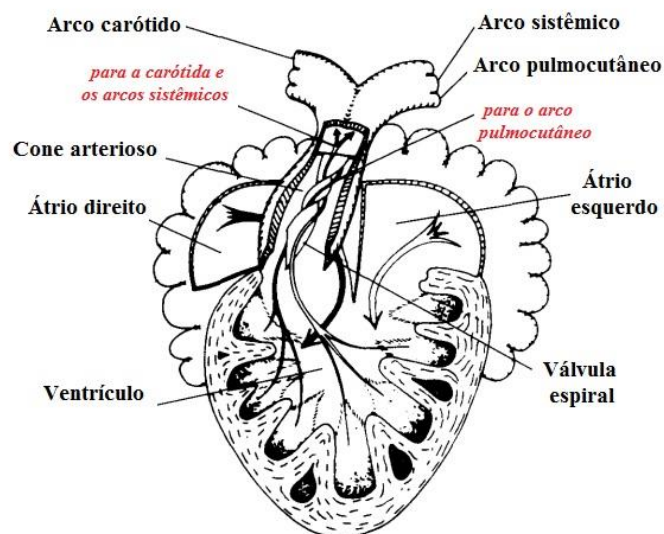


Imagem adaptada de BURGGREN; FARRELL; LILLYWHITE, 2011.

Após reconhecer todo este conjunto de características cardíacas tão refinadas e específicas, é válido ressaltar um aspecto que em 1980 foi levantado por JOHANSEN; BURGGREN (1980). Estes autores enfatizam que os anfíbios e demais vertebrados “basais” não deveriam ser classificados como “inferiores”, mas sim organismos altamente adaptados com sistemas apropriados para desempenhar os melhores padrões de interação com o seu ambiente.

#### **1.4. Morfofisiologia dos miócitos ventriculares de anfíbios**

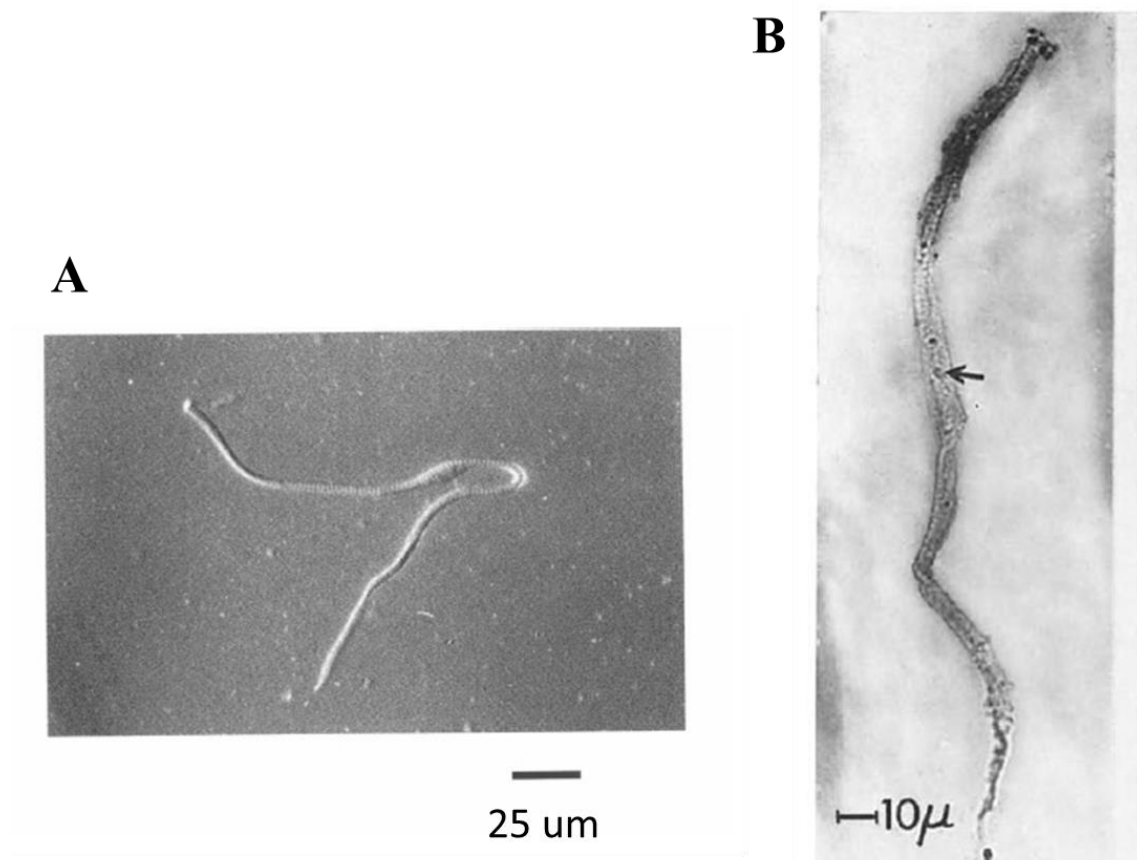
Os anfíbios apresentam uma ampla variedade de especializações ao ambiente em que vivem, e requerem determinadas características, como por exemplo a umidade, pH, oxigenação, salinidade, bem como diferentes requerimentos na alimentação, na temperatura, dentre outros (HOPKINS, 2007). Uma vez submetidos a variações no ambiente, os anfíbios são capazes de desenvolver diversas estratégias fisiológicas e bioquímicas que envolvem adaptações ecológicas, estilos de vida, e peculiaridades anatômicas (CAREY; ALEXANDER, 2003). Essa elevada variabilidade influencia a demanda imposta ao coração desses animais, implicando, conseqüentemente, em uma grande diversidade morfológica e de adaptações fisiológicas em sua função cardíaca (LILLYWHITE; ZIPPEL; FARRELL, 1999; BURGGREN; FARRELL; LILLYWHITE, 2011).

Embora os mecanismos envolvidos na interação entre as principais proteínas da contração cardíaca (actina e miosina) sejam similares entre os vertebrados (BERS, 2001; SHIELS; GALLI, 2014), os anfíbios apresentam algumas distinções anatômicas e estruturais em seus miócitos, além de diferenças fisiológicas quanto à funcionalidade dos canais envolvidos na contratilidade cardíaca, especialmente no que diz respeito à origem do  $Ca^{2+}$  a ser utilizado (STALEY; BENSON, 1968; FORBES; SPERELAKIS, 1971; TIBBITS; HOVEMADSEN; BERS, 1991).

Em comparação com os mamíferos, os miócitos (células que compõem o tecido cardíaco) possuem um diâmetro reduzido (1 a 12.5  $\mu$ m) (Figura 2) (BARR; DEWEY; BERGER, 1965; PAGE; NIEDERGERKE, 1972; BOSSEN; SOMMER, 1984; KEEN; FARREL, 1992; COLOMO et al., 1997; BRANDT et al., 1998; TIBBITS; XU; SEDARAT, 2002). Essa característica é de grande importância, pois uma vez reduzida a distância de difusão dos íons, mais rápido se torna o influxo e o efluxo iônico (HUANG, 1967; SOMMER; JOHNSON, 1970).

Além disso, os miócitos dos mamíferos possuem invaginações da membrana que se chamam (túbulos transversos ou túbulos- T). Essas estruturas são especializadas na rápida transferência dos sinais elétricos da superfície das células para o seu interior, o que permite uma contração quase que simultânea de todas as miofibrilas (FORBES; SPERELAKIS, 1971). Nos anfíbios, por sua vez, o sistema de túbulos- T é bastante rudimentar, senão ausente (FORBES; SPERELAKIS, 1971; PAGE; NIEDERGERKE, 1972; KEEN; FARREL, 1992), o que corrobora a importância de um diâmetro reduzido em seus miócitos. Quanto à disposição das miofibrilas, nos anfíbios os arranjos se concentram nas regiões mais periféricas dos miócitos, justapostas à face interna da sarcolema, (HUANG, 1967; TIBBITS; XU; SEDARAT, 2002).

**FIGURA 2 - Fotomicrografia eletrônica de miócitos isolados de anfíbios**



**A** - Fotomicrografia do miócito isolado de *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771). **B** - Fotomicrografia do miócito isolado de *Lithobates pipiens*. Aumento: 12.000 vezes. (Fontes: BARR; DEWEY; BERGER, 1965; COLOMO et al., 1997).

Todas estas características concentram adaptações extremamente importantes no que diz respeito a reduzir as distâncias e facilitar a difusão, especialmente dos íons cálcio que são requeridos durante a contração cardíaca. No caso dos mamíferos, existe uma organela especializada conhecida como retículo sarcoplasmático (RS) que fica responsável pela modulação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, liberando e estocando  $\text{Ca}^{2+}$  para ser utilizado pela célula (BURGGREN; FARRELL; LILLYWHITE, 2011; SHIELS; GALLI, 2014). Para os anfíbios, esta organela a princípio não demonstrou um papel muito significativo em espécies de ambiente temperado passando, portanto, a ser considerada como uma organela rudimentar nos anfíbios em geral (NIEDERGERKE, 1963; KAVALER, 1974; BOSSEN; SOMMER, 1984; TUNSTALL; CHAPMANT, 1994; TIJSKENS; MEISSNER; FRANZINI-ARMSTRONG, 2003).

Análises de microscopia eletrônica realizadas em tecido ventricular de *Rana pipiens* demonstraram a presença de um retículo sarcoplasmático esparso, e composto de duas regiões contínuas e distintas, que foram denominadas de porções tubular e terminal (PAGE; NIEDERGERKE, 1972; BOSSEN; SOMMER, 1984). A maior porção do RS tubular circunda as miofibrilas ao nível da linha Z. O restante da porção tubular fica orientada paralelamente às miofibrilas, nas porções mais periféricas (BOSSEN; SOMMER, 1984). Os ramos do RS tubular que ficam na região subsarcolemal dos miócitos terminam em estruturas planas semelhantes a sacos, e são chamados de RS terminal (BOSSEN; SOMMER, 1984). O diâmetro da porção tubular do RS varia entre 35 e 60 nm.

Contudo, todos os estudos acima citados foram realizados em centros de pesquisa europeus, sendo desenvolvidos exclusivamente com um número reduzido de espécies, de ambiente temperado, o que pode gerar conclusões genéricas. De fato, mais recentemente pesquisas realizadas com espécies dotadas de um metabolismo mais elevado e provenientes de habitats tropicais observaram grande funcionalidade do RS como fonte de cálcio intracelular (SUBRAMANI; VIJAYANAND; THARION, 2002; SUBRAMANI et al., 2005). Essas pesquisas abriram novos horizontes no que diz respeito aos estudos de fisiologia cardíaca comparada. Sendo assim, faz-se necessária a realização de mais estudos a fim de se determinar se outras espécies também apresentam adaptações cardíacas proporcionais às demandas metabólicas e ambientais a elas impostas.



### **1.5. O acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C) e o relaxamento cardíaco em anfíbios**

O acoplamento E-C compreende o conjunto de eventos que ocorrem desde a excitação da membrana do miócito até o desencadeamento da contração (BERS, 2001). Assim como nos demais vertebrados, nos anfíbios o acoplamento E-C se inicia com um potencial de ação que despolariza a sarcolema (MORAD; ORKAND, 1971). A despolarização da membrana promove a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes do tipo “L” (canais-L, lentos), os quais permitem o influxo principal de cálcio a ser alocado diretamente nas miofibrilas (STALEY; BENSON, 1968; MORAD; GOLDMAN; TRENTHAM, 1983). Esses canais também são conhecidos como receptores de dihidropiridinas devido à afinidade por esses compostos, e são caracterizados pelo tempo relativamente longo que levam para se abrir e fechar, sendo responsáveis pelo platô característico dos potenciais de ação da musculatura cardíaca. (BERS, 2001). Além dos canais-L, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) atuando em seu modo reverso também apresenta uma importante participação no influxo de cálcio extracelular, no entanto em menor extensão do que os canais-L (SHUBA et al., 1998; CIFUENTES; VERGARA; HIDALGO, 2000). A princípio, supondo-se que os anfíbios em geral não apresentavam um RS funcional, esse influxo de cálcio através da sarcolema, (via canais-L em sua maior parte, mas também via NCX) era considerado como a fonte exclusiva de cálcio a ser utilizado na contração cardíaca destes animais (ANDERSON; HIRSCH; KAVALER, 1977; FABIATO; FABIATO, 1978; MORAD; GOLDMAN; TRENTHAM, 1983).

Embora até o momento não haja estudos que descrevam as vias de cálcio envolvidas na contratilidade cardíaca das espécies de anfíbios que apresentam um retículo sarcoplasmático funcional (SUBRAMANI; VIJAYANAND; THARION, 2002; SUBRAMANI et al., 2005), supõe-se que os mecanismos de ativação do acoplamento E-C nesta espécie possam ser semelhantes aos dos outros vertebrados basais que também apresentam um retículo funcional, como por exemplo alguns peixes de alta atividade metabólica (SHIELS et al., 1999; SHIELS; FARRELL, 2000; RIVAROLI; RANTIN; KALININ, 2006). Nessas espécies, a ativação do acoplamento E-C ocorre como resposta a um aumento na concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  (TIBBITS; HOVEMADSEN; BERS, 1991). Esse aumento depende da mobilização deste íon através dos canais-L, do trocador NCX (em seu modo reverso), e também das reservas intracelulares do RS (HOVE-MADSEN, 1992).

Em espécies como o atum (*Thunnus* spp), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o curimatá (*Prochilodus lineatus*) o RS pode atuar inclusive como a principal fonte de  $Ca^{2+}$  para a contração (SHIELS et al., 1999; SHIELS; FARRELL, 2000; ANELLI et al., 2004; RIVAROLI; RANTIN; KALININ, 2006).´

Com relação ao relaxamento cardíaco, nos vertebrados, sabe-se que é necessária uma redução da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  até que se atinjam os níveis diastólicos (BERS, 2001) Para a maior parte dos vertebrados basais o  $Ca^{2+}$  é removido do citoplasma através da bomba de  $Ca^{2+}$  sarcolemal, mas principalmente pelo NCX (TIBBITS; HOVEMADSEN; BERS, 1991; DRIEDZIC; GESSER, 1994a; XUE et al., 1999). Nos anfíbios em especial, estudos demonstram que o efluxo de cálcio também ocorre através da sarcolema (STALEY; BENSON, 1968; FABIATO; FABIATO, 1978), sendo o NCX o principal mecanismo observado em tecidos atriais (GOTO et al., 1972; ROULET et al., 1979; HARTZELL, 1984). Dessa forma, durante o ciclo cardíaco dessas espécies de anfíbios, o RS também não apresenta uma participação significativa nos mecanismos de relaxamento (FABIATO; FABIATO, 1978). Contudo, tais informações também são baseadas prioritariamente na literatura referente às espécies de ambientes temperados, tornando imprescindível a obtenção de um conhecimento pormenorizado do acoplamento E-C cardíaco de anfíbios neotropicais numa tentativa de verificar a validade destes argumentos para esses animais. Os anfíbios que apresentem um RS funcional supostamente irão depender da atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA) para o estoque de  $Ca^{2+}$  dentro do RS (FABIATO; FABIATO, 1978). Cabe salientar ainda que todos os estudos acerca dos mecanismos envolvidos no acoplamento E-C dos anfíbios foram realizados somente em espécimes machos, ou em machos e fêmeas sem distingui-los, fazendo-se necessária uma nova abordagem que leve em consideração possíveis diferenças fisiológicas entre os sexos.

## **1.6. O eletrocardiograma e a frequência cardíaca dos anfíbios anuros**

Em 1885, Willem Einthoven, um médico e fisiologista holandês, publicava seu artigo mais clássico “A forma do eletrocardiograma humano”. Nessa obra, o fisiologista descreveu seus métodos matemáticos e derivações que deram origem ao primeiro galvanômetro de corda, que seria o primeiro mecanismo para aquisição de registros eletrocardiográficos (EINTHOVEN, 1885). Tal técnica era baseada no princípio de que os líquidos corpóreos atuam como bons condutores, sendo assim, o eletrocardiograma seria

capaz de registrar as variações dos potenciais de ação elétricos na superfície do corpo (EINTHOVEN, 1885).

O eletrocardiograma representa não somente um dos mecanismos mais antigos, mas continua sendo até hoje um dos métodos mais utilizados em procedimentos laboratoriais cardiovasculares (FISCH, 2000). Amplamente utilizada na medicina, essa técnica trouxe inúmeros avanços no que diz respeito aos estudos sobre a cardiologia humana e ao desenvolvimento de terapias e tratamentos para cardiopatias (FISCH, 2000).

Além da medicina, o eletrocardiograma também possui diversas aplicações em áreas biológicas, veterinárias, fisiológicas e ecológicas (AUBRET; TORT; BLANVILLAIN, 2013). Nestas áreas em especial, a determinação da frequência cardíaca dos animais é de grande relevância uma vez que pode trazer informações, diretas ou indiretas, de diversas funções biológicas, como por exemplo o nível metabólico do organismo, os estados de saúde, etc. (AUBRET; TORT; BLANVILLAIN, 2013).

Apesar de sua ampla utilização em pesquisas biológicas, no caso dos anfíbios em especial, os estudos envolvendo o eletrocardiograma e a descrição da frequência cardíaca destes animais ainda são bastante limitados (MULLEN, 1974; KIBLER et al., 2017). Tal limitação decorre das dificuldades em adaptar a metodologia aos diferentes tamanhos dos animais, e dos desafios para se obter registros sem interferências que possam mascarar resultados reais (KIBLER et al., 2017).

Os primeiros registros de eletrocardiografias obtidas em anfíbios anuros datam de 1960, utilizando um sistema semelhante ao desenvolvido por Einthoven, porém com múltiplos eletrodos inseridos de forma subcutânea, e realizado em *Xenopus laevis* (FURMAN, 1960). Anos depois, o mesmo método foi adaptado para *Rana esculenta*, (atual *Phelophylax esculenta*) na tentativa de utilizar somente um eletrodo subcutâneo, o que acabou gerando registros com uma quantidade significativa de ruídos (FRANCAZ; AUPY, 1969). Somente em 1974 surgiram as primeiras descrições do método de “três pontos”, que vem sendo utilizado até os dias atuais (MULLEN, 1974). Ao utilizar espécimes pertencentes às famílias *Bufonidae* e *Leptodactylidae*, animais de maior tamanho corpóreo e fácil manuseio, além de uma nova derivação que incluía três pontos em forma triangular (semelhante à proposta para os humanos), essa nova forma de procedimento tornou possível a obtenção de bons registros que permitiram a observação dos componentes do eletrocardiograma (MULLEN, 1974). Desde então, as metodologias que seguiram mantiveram esses protocolos básicos, adaptando-

os às devidas espécies e aos objetivos de suas pesquisas (LIU et al., 2000; CHAPOVETSKY; KATZ, 2003; SHEMAROVA et al., 2009; KIBLER et al., 2017).

No entanto, todas essas metodologias são baseadas em procedimentos bastante invasivos, uma vez que a inserção de eletrodos subcutâneos pode gerar diversos efeitos de estresse nos animais, causando respostas adrenérgicas que podem alterar a frequência basal dos animais (WASSERSUG; PAUL; FEDER, 1981). A própria utilização de anestésicos e outros produtos farmacológicos durante os procedimentos cirúrgicos para a inserção e acomodação dos eletrodos também pode causar alterações nos resultados (WILLIAMS et al., 2017). Além disso, os estágios de recuperação pós cirurgia devem ser extremamente cautelosos, pois quaisquer respostas inflamatórias ou infecciosas podem gerar complicações nos experimentos (MACHIN, 1999; STEVENS, 2011; WILLIAMS et al., 2017). Por fim, o próprio mal posicionamento dos eletrodos na pele podem causar incômodo ou dor nos animais, também gerando estímulos estresse-induzidos que podem alterar os resultados do eletrocardiograma.

Nesse sentido, com o objetivo de criar novas adaptações que possam reduzir os impactos e tornar os procedimentos menos invasivos, o presente estudo propôs-se a adaptar as metodologias de eletrocardiograma para anfíbios já existentes, através da utilização de eletrodos externos que excluem a necessidade de procedimentos cirúrgicos e anestésicos. É importante salientar o fato de que todos os trabalhos supracitados foram realizados somente com machos ou com ambos sexos sem distinção. Dessa forma, torna-se necessária também uma comparação mais criteriosa de ambos sexos a fim de se determinar se existem diferenças entre as características cardíacas entre eles. O estudo eletrofisiológico em sexos distintos de anfíbios anuros possui grande relevância para o entendimento da organização estrutural cardíaca específica destes animais, bem como os padrões evolutivos e adaptativos da função cardíaca às diferentes demandas que podem ser impostas a cada gênero sexual.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar e comparar a função cardíaca de machos e fêmeas do sapo cururu, *Rhinella icterica*, e verificar se existe alguma relação entre a funcionalidade cardíaca e a taxa metabólica de cada sexo.

### 2.2. Objetivos específicos:

- Analisar e comparar a frequência cardíaca basal de machos e fêmeas de *R. icterica* por meio de uma técnica de eletrocardiograma pouco invasiva;
- Analisar comparativamente os componentes do eletrocardiograma (ondas P, T e B; complexo QRS, Segmento S-T, e intervalos P-R e Q-T).
- Analisar e comparar a taxa metabólica padrão de machos e fêmeas de *R. icterica*.
- Determinar e comparar a funcionalidade do retículo sarcoplasmático em machos e fêmeas de *R. icterica* por meio de protocolos *in vitro* de contratilidade cardíaca com utilização de rianodina: força de contração e parâmetros tempo-dependentes;
- Determinar e comparar funcionalidade e importância do trocador NCX em machos e fêmeas de *R. icterica* por meio de protocolos *in vitro* de contratilidade cardíaca com utilização de LiCl: força de contração, e parâmetros tempo-dependentes;
- Determinar e comparar funcionalidade e importância da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase em machos e fêmeas de *R. icterica* por meio de protocolos *in vitro* de contratilidade cardíaca com utilização de Ouabaína: força de contração, e parâmetros tempo-dependentes;
- Analisar e comparar os níveis de expressão das proteínas cardíacas: SERCA, PLB e NCX

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção dos animais e manutenção

Quarenta espécimes de *Rhinella icterica* (20 machos e 20 fêmeas) foram coletados em seu habitat natural (SISBIO Protocolo 18566-1), nos arredores do Sítio da família Salinas (DMM: -23.918155, -47.470454). A identificação da espécie e distinção entre os sexos foram baseadas em critérios morfológicos e taxonômicos (KWET; DI-BERNARDO; MANEYRO, 2006), além dos padrões de vocalização (FORTI, 2009). As coletas foram realizadas nos meses de janeiro a dezembro, em 3 anos consecutivos (2015 a 2017). Esses meses correspondem ao período reprodutivo no qual os bufonídeos se encontram ativos e podem ser devidamente encontrados (FORTI, 2009; DOS SANTOS; AMATO; BORGES-MARTINS, 2013). Após as coletas, 20 animais (10 fêmeas e 10 machos) foram transportados ao Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, *Campus* São Carlos, para as análises *in vivo* e para as análises moleculares. A outra metade dos animais foi destinada ao Laboratório de Fisiologia da Conservação da UFSCar (*Campus* Sorocaba). Nestes laboratórios, os animais permaneceram por 15 dias para a recuperação do estresse decorrente do transporte e para aclimação às condições laboratoriais.

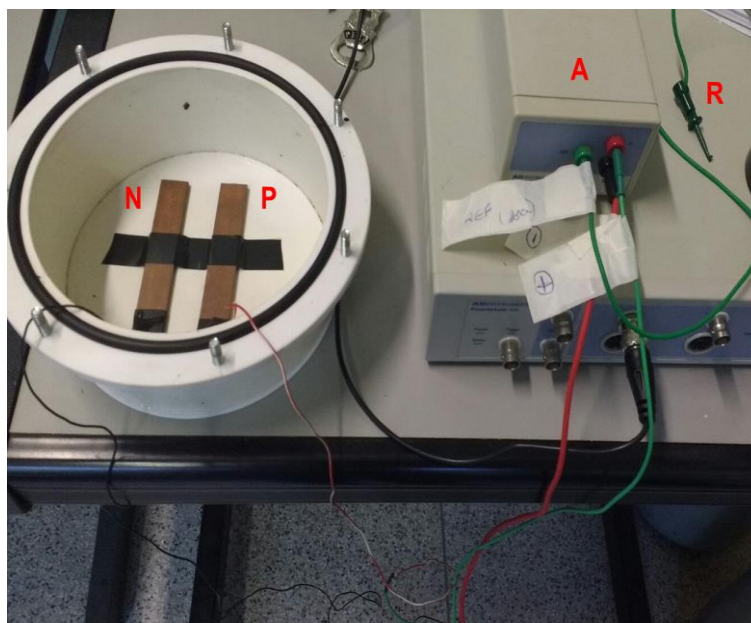
Em laboratório, os indivíduos foram mantidos em recipientes plásticos opacos de (37 cm comprimento x 27 cm largura x 32 cm altura) contendo 50 ml de água declorada para manter a umidade. A água dos aquários foi trocada diariamente e os recipientes foram mantidos sob fotoperíodo natural (~ 12h claro: 12h escuro). A alimentação foi realizada diariamente, sendo fornecidas 2 larvas (aproximadamente 0,5 g) de tenébrio gigante (*Zophobas morio*) entre as 18 e 19 horas, período natural de regime alimentar de *R. icterica* (MCWILLIAMS, 2008; SABAGH; CARVALHO-E-SILVA, 2008; DOS SANTOS; AMATO; BORGES-MARTINS, 2013). Todos os procedimentos foram aprovados de acordo com o Conselho de Ética em experimentação animal vigente (Anexo 1: CEUA nº 4225240315).

### 3.2. Determinação da frequência cardíaca basal *in vivo*

Para a determinação da frequência cardíaca basal *in vivo*, os protocolos usuais que se baseiam na inserção subcutânea de eletrodos (TAYLOR et al., 2012; KIBLER et al., 2017) foram modificados e adaptados com a finalidade de reduzir o estresse de manuseio, bem como quaisquer procedimentos cirúrgicos que pudessem interferir nas respostas cardíacas. Para tanto, adotou-se o mesmo princípio no qual se baseia o eletrocardiograma convencional realizado em humanos: a utilização de um metal altamente condutor que consiga captar os impulsos elétricos que são propagados desde o coração até a superfície externa do corpo, e um sistema de aquisição que consiga filtrar os sinais adequadamente. Sendo assim, para a confecção dos eletrodos foram utilizadas duas placas de cobre (7 x 2 cm). A vantagem em se utilizar o cobre consiste na sua maior resistência à corrosão e ótima condutância elétrica (SOWMIYA; JAYANTHI, 2014).

Os eletrodos de cobre foram posicionados em uma câmara circular com tampa (14 cm diâmetro x 15.5 cm altura): a primeira placa representando o eletrodo positivo, posicionada à direita e a segunda placa posicionada à esquerda, representando o eletrodo negativo. Ambas placas foram ligadas a fios os quais foram conectados a um pré-amplificador (PowerLab – ADInstruments Modelo: ML224). Um terceiro eletrodo de referência foi deixado fora da câmara (Figura 4).

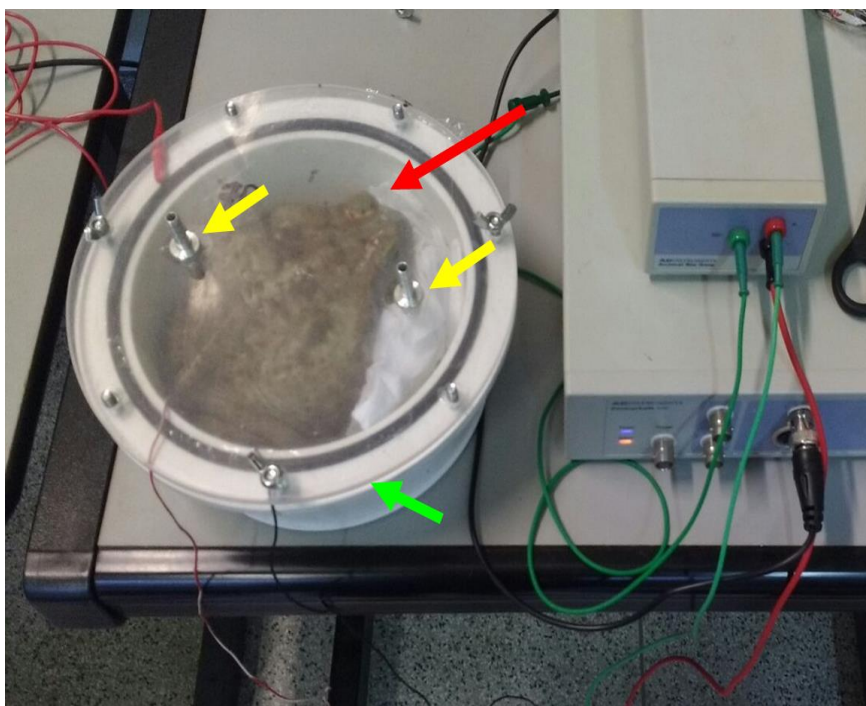
**FIGURA 4 - Montagem do sistema de aquisição do Eletrocardiograma**



**N**- Eletrodo negativo; **P** - eletrodo positivo; **R** - Eletrodo de referência; **A** - amplificador.

Os animais foram posicionados dentro da câmara de modo que os eletrodos permanecessem em contato com a região ventral do organismo, próximos à direção do coração. A câmara foi fechada mantendo espaços nas bordas laterais (1 cm) e dois canais superiores para fluxo livre de ar (Figura 5).

**FIGURA 5 – Posicionamento do anfíbio na câmara experimental.**



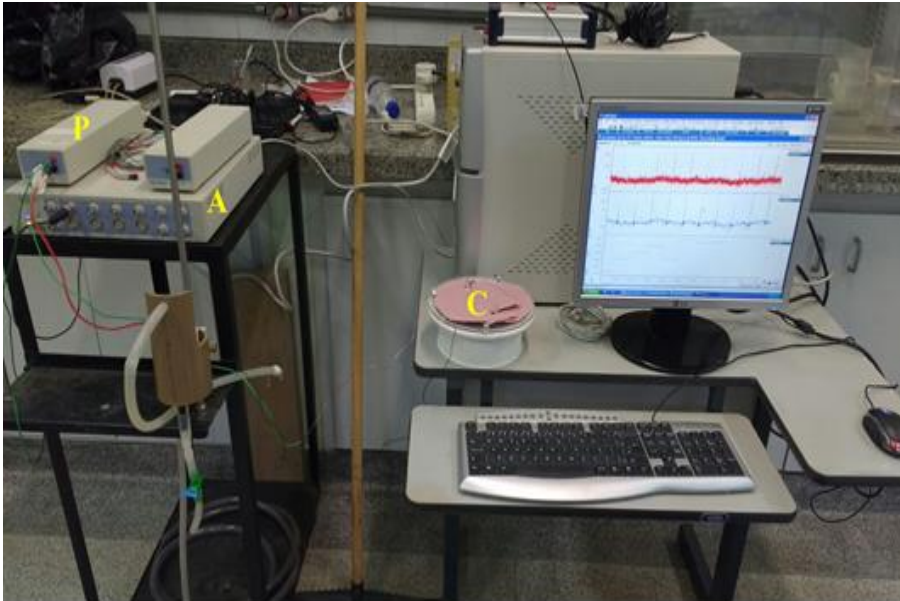
Seta vermelha: posicionamento do animal na câmara; Setas amarelas: canais para fluxo de ar; Seta verde: borda lateral aberta para permitir fluxo de ar.

Os animais permaneceram dentro das câmaras durante 6 horas para aclimação, em seguida os registros de ECG foram obtidos ininterruptamente por 24 horas para obtenção da frequência cardíaca basal (fh – em repouso). É válido ressaltar que os processos digestórios elevam o metabolismo base do animal (ANDRADE et al., 2005; TAYLOR et al., 2012). Por essa razão, a alimentação foi cessada 3 dias antes do início das aquisições (TAYLOR et al., 2012). Durante o período de aquisição dos dados os animais permaneceram em temperatura constante (25 °C) e sob ciclo de iluminação natural (12h claro/escuro). Os registros foram gravados e os sinais amplificados e filtrados por um processador digital (ML 136 Animal Bio Amp, ADInstruments) conectado ao sistema de aquisição e de análise de dados Power Lab (Figura 6).



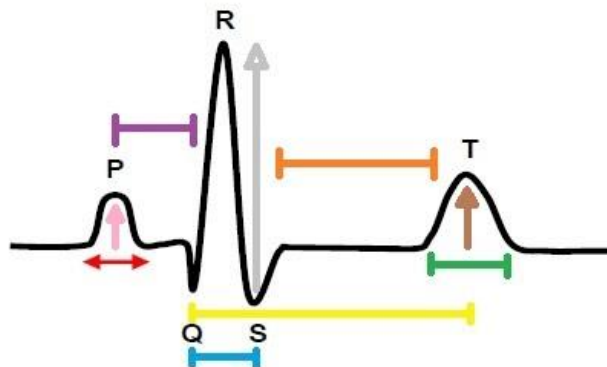
A frequência cardíaca basal dos animais foi determinada pela contagem do número de complexos QRS obtidos nos registros de ECG, sendo expressa em batimentos por minuto (bpm). A análise eletrocardiográfica foi realizada através dos valores de duração e amplitude das ondas P, T e do complexo QRS, além da duração do segmento S-T e dos intervalos P-R, R-R e Q-T. As análises eletrocardiográficas foram realizadas de acordo as predefinições resumidas na figura 7 (ABEDIN; CONNER, 2008; KHAN, 2008).

**FIGURA 6: Sistema completo de aquisição do eletrocardiograma**



C - câmara contendo o animal; P - pré-amplificador; A - amplificador e filtro.

**FIGURA 7 - Componentes básicos do eletrocardiograma**



Marcação vermelha: duração da onda P (corresponde à despolarização atrial); Marcação rosa: amplitude da onda P (voltagem da onda P); Marcação roxa: intervalo P-R (corresponde ao o tempo de condução atrioventricular); Marcação azul: duração do complexo QRS (corresponde à despolarização ventricular); Marcação cinza: amplitude do complexo QRS (voltagem do complexo QRS); Marcação amarela: duração do intervalo Q-T (Corresponde a sístole elétrica total ventricular); Marcação laranja: duração do segmento S-T (corresponde à fase

inicial da repolarização ventricular e representa a fase de platô do potencial de ação ventricular); Marcação verde: duração da onda T (representa a repolarização ventricular); Marcação marrom: amplitude da onda T (corresponde à voltagem no pico da onda T).

Ao final dos registros eletrocardiográficos os animais retornaram aos recipientes de manutenção para recuperação do stress do manuseio e da experimentação, permanecendo em reaclimação por 7 dias, para posterior utilização nos ensaios de taxa metabólica.

### 3.3. Determinação da taxa metabólica padrão

A alimentação dos animais foi interrompida 5 dias antes do início do protocolo experimental. Cada animal foi colocado em uma câmara circular (aproximadamente 14 cm diâmetro x 15.5 cm diâmetro). Essas câmaras foram as mesmas utilizadas no eletrocardiograma, porém sem a montagem dos eletrodos (Figura 8).

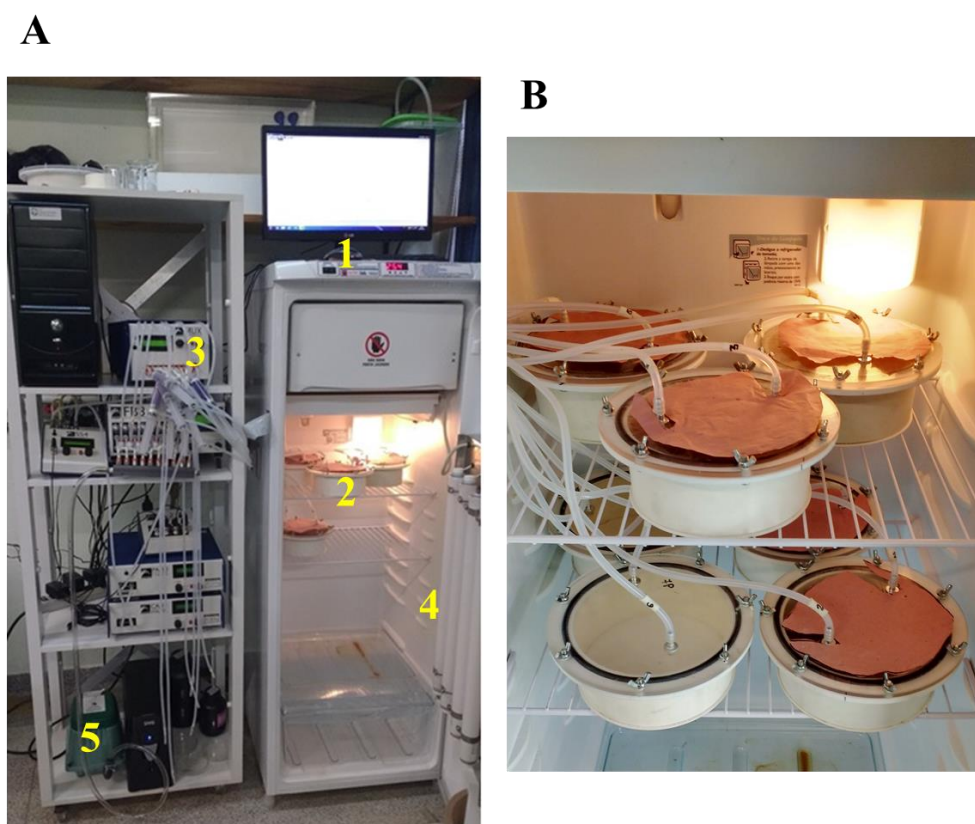
**FIGURA 8 – Câmara respirométrica**



A taxa metabólica padrão (TMB: ml O<sub>2</sub>/g/h) foi aferida nos animais em estado de repouso, através de medidas de consumo de oxigênio realizadas durante um total de 142 horas em temperatura constante de 25°C, durante 24 horas de registro. O consumo de O<sub>2</sub> foi obtido utilizando um sistema de respirometria fechada intermitente controlada por software (Sable Systems) no qual a taxa de consumo de O<sub>2</sub> foi calculada a partir da queda na concentração de oxigênio durante 10 minutos de registro em cada câmara, separadamente, uma por vez. Quando o sistema está fechado, o ar é bombeado em um circuito que envolve a

câmara respirométrica e o analisador de O<sub>2</sub> (Sable Systems PA-10). A taxa metabólica é calculada pela queda na concentração de O<sub>2</sub>, que é registrada na frequência de 1 amostra por segundo. Todas as câmaras foram mantidas dentro de uma estufa climatizada (BOD Eletrolab – EL 202/2) para controlar a temperatura e o fotoperíodo. Para as análises, o decaimento de O<sub>2</sub> durante o período de leitura foi considerado válido para cálculos quando linear ( $r^2 > 0,7$ ). A figura 9 resume os equipamentos utilizados nestes experimentos.

**FIGURA 9 - Set experimental de respirometria de fluxo fechado.**



**A** - Sistema de respirometria. 1: Software de aquisição; 2: Câmaras respirométricas; 3: analisador de O<sub>2</sub>; 4: Câmara climatizadora (BOD); 5: bomba de ar. **B**: Disposição das câmaras respirométricas na BOD. Notar a existência de duas cânulas, uma que insere ar na câmara e outra que o retira.

### 3.4. Eutanásia e coleta das amostras

Os mesmos animais utilizados para as análises *in vivo* (frequência cardíaca basal e taxa metabólica padrão) foram posteriormente eutanasiados (n= 20) via imersão em benzocaína (20g/ l) para absorção transdérmica e consequente depressão do sistema nervoso central (CLOSE et al., 1997; MACHIN, 1999; STEVENS, 2011; AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2013). Estes animais foram utilizados

posteriormente para a obtenção do tecido cardíaco ventricular para as análises moleculares. Para as análises *in vitro*, outros 20 indivíduos (10 machos e 10 fêmeas) foram eutanasiados por espinhalamento e destruição cerebral, a fim de evitar interferências dos anestésicos sobre as análises (MACHIN, 1999; AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2013). Após a eutanásia, foi realizada uma incisão na região abdominal para exposição do coração e retirada do tecido ventricular. Todos os procedimentos de anestesia e eutanásia deste trabalho foram aprovados pelo COBEA (CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais UFSCar – Aprovação N° 4225240315), e visam evitar o sofrimento do animal, bem como quaisquer interferências sobre os parâmetros a serem analisados (O’ROURKE, 2007; STEVENS, 2011). Após a retirada dos tecidos ventriculares, os anfíbios nativos foram fixados em formol 10%, e catalogados para posterior depósito no museu de Zoologia da UNICAMP (IB - Campinas/SP).

### **3.5. Determinação da função cardíaca “*in vitro*”.**

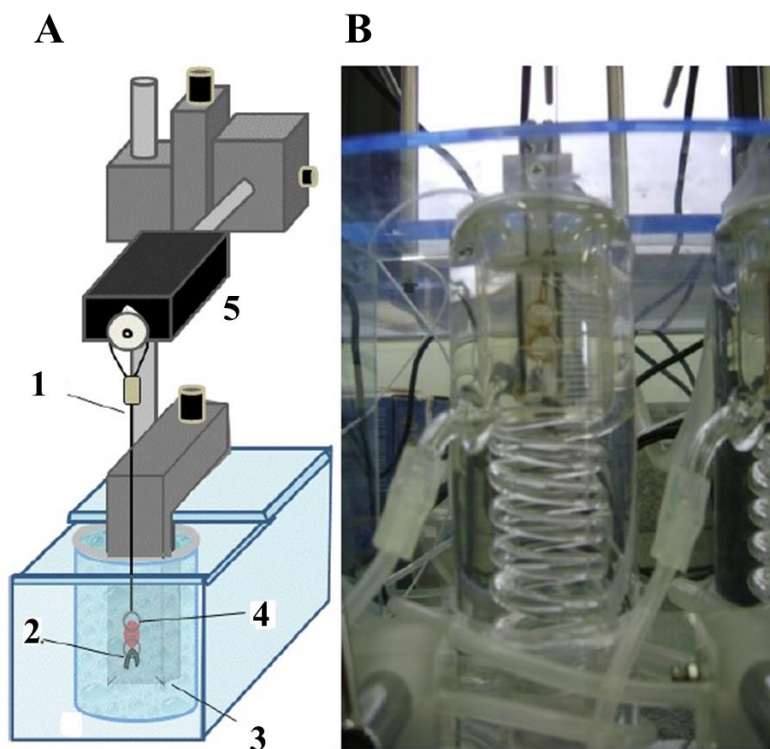
#### **3.5.1. Preparação das Tiras Ventriculares**

Todos os protocolos *in vitro* foram desenvolvidos baseando-se na metodologia desenvolvida por COSTA et al., 2008 para tiras ventriculares de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). Após a eutanásia dos animais, o coração foi removido e dissecado para remoção do tecido atrial. Em seguida, tiras ventriculares (n = 10; ~ 3 mm de largura; massa =  $3.7 \pm 0.2$  mg) de cada grupo experimental foram preparadas através de cortes transversais do ventrículo. Tais medidas das tiras são importantes para garantir que sejam finas o suficiente para garantir uma difusão adequada de oxigênio do meio externo até o seu interior, evitando hipóxia das fibras mais internas e, por conseguinte, alterações em suas tensões isométricas (SHIELS; VORNANEN; FARRELL, 2002). O tecido do ápice do ventrículo foi desprezado com a finalidade de precaver a ocorrência de contrações espontâneas durante os experimentos. Todos os procedimentos de preparação das tiras ventriculares foram realizados com as mesmas imersas em solução fisiológica gelada adaptada para anfíbios com a seguinte composição (em mM): 115 NaCl, 5 KCl, 30 NaHCO<sub>3</sub>, 0,94 MgSO<sub>4</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, e 5 glicose.

As extremidades das tiras foram cuidadosamente presas a duas argolas metálicas e transferidas para cubetas termostáticas (25 °C) contendo 20 ml de solução fisiológica de anfíbios e borbulhamento constante de gás carbogênio. A mistura carbogênica

(2% CO<sub>2</sub> e 98% O<sub>2</sub>; São Carlos Gases®) visa manter a solução fisiológica em um pH em torno de 7,4 a 25 °C. Uma vez dentro das cubetas, uma extremidade da tira foi conectada, por meio de uma das argolas metálicas, a um gancho da parte terminal de um eletrodo de estimulação de platina. A argola da outra extremidade foi atada a uma linha cirúrgica não elástica que, por sua vez, foi fixada em um transdutor de força isométrica (AVS, Solução Integrada Ltda, Brasil). A figura 10 mostra o esquema detalhado dessa preparação.

**FIGURA 10 - Preparação das tiras ventriculares no set experimental**



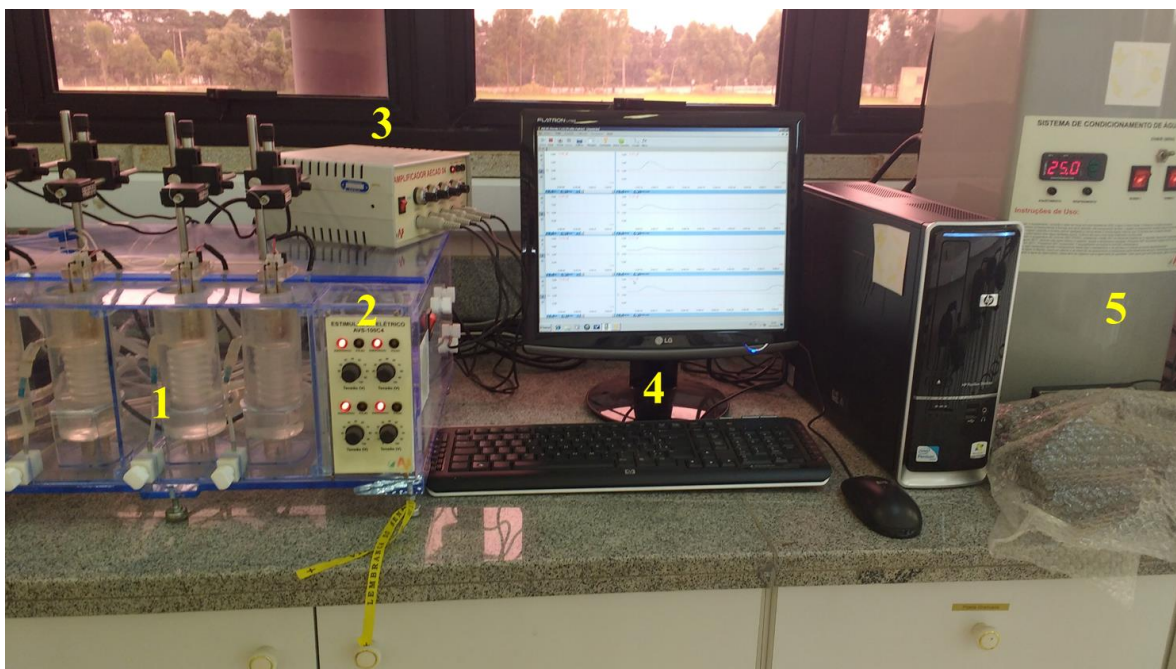
Preparação das tiras ventriculares para aquisição dos dados *in vitro*; **A** – **1**) Linha cirúrgica da preparação da tira ventricular acoplada ao transdutor de força. **2**) Outra extremidade da preparação presa ao gancho imerso em solução fisiológica. **3**) Eletrodo de platina responsável pela transmissão dos impulsos elétricos. **4**) Detalhe da tira ventricular imersa em solução fisiológica. **B** - Foto representativa do transdutor de força.

Os eletrodos de estimulação de platina foram conectados a estimuladores (AVS 100C4, Solução Integrada Ltda., Brasil), os quais geravam impulsos elétricos quadrados com 8 ms de duração e uma voltagem 50% superior àquela necessária para que se que atinja o limiar da resposta contrátil (~80 V). Os transdutores de força isométrica foram conectados a um amplificador (AECAD 04, AVS, Solução Integrada Ltda., Brasil), o qual enviava os sinais



a um computador para o registro das tensões isométricas por meio de um software de aquisição e tratamento de dados (AQCAD AVS, Solução Integrada, Ltda, Brasil). A figura 11 resume as imagens deste conjunto de equipamentos.

**FIGURA 11 – Set experimental de aquisição *in vitro*.**



**1:** set experimental contendo as cubetas; **2:** Estimulador elétrico; **3:** amplificador de força; **4:** sistema informatizado de aquisição e tratamento dos dados. **5:** banho termostatizado.

As preparações foram estiradas até que se obtivesse uma relação constante entre o comprimento da preparação e a força de contração desenvolvida. Este procedimento segue a lei de Frank-Starling que determina que a força de contração cardíaca está diretamente relacionada ao grau de estiramento da fibra miocárdica (ALLEN; KENTISH, 1985). Após um período de estabilização (40 minutos à frequência de estimulação de 0,2 Hz - 12 bpm), os seguintes protocolos experimentais foram realizados:

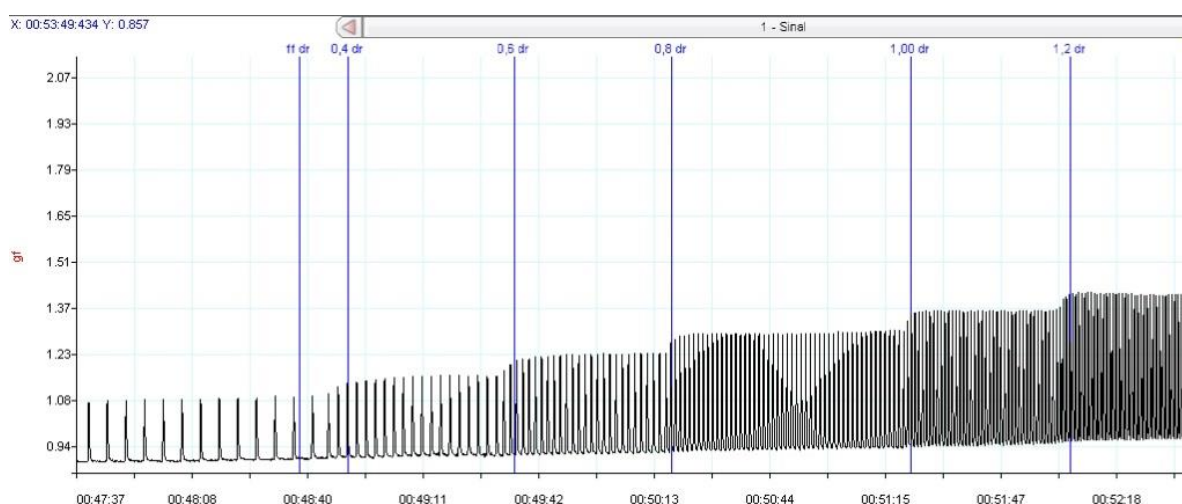
### 3.5.2. Protocolos Experimentais

#### 3.5.2.1. Aumento da frequência de estimulação (relação força-frequência)

Este protocolo foi realizado com o objetivo de determinar a capacidade do miocárdio dos anfíbios em manter o acoplamento E-C frente a incrementos da frequência de

estimulação. A frequência de estimulação foi elevada gradativamente, em incrementos de 0,2 Hz, partindo da frequência inicial de 0.2 Hz, até atingir a frequência máxima na qual as tiras ainda eram capazes de se contrair regularmente. Essa relação força-frequência permite avaliar o desenvolvimento da força isométrica de contração do miocárdio desde frequências subfisiológicas até supra-fisiológicas. Foram consideradas frequências máximas de estimulação aquelas nas quais 80% das tiras ventriculares ainda foram capazes de se contrair regularmente. Partindo destes registros, os parâmetros analisados foram: força de contração (FC:  $\text{mN/mm}^2$ ), tempo para o pico de tensão (TPT: ms) e tempo para 50% do relaxamento (THR: ms). A figura 12 demonstra um registro das contrações de *R. icterica* onde foi realizado este protocolo.

**FIGURA 12 – Registro das contrações ventriculares *in vitro* de *Rhinella icterica***



Registro das contrações isométricas desenvolvidas pela tira ventricular de um espécime fêmea de *Rhinella icterica*, submetida a incrementos na frequência de estimulação (de 0.2 Hz a 1.2 Hz).

### 3.5.2.2. Adição de Rianodina

Com a finalidade de verificar a presença e a importância funcional do retículo sarcoplasmático (RS) de forma comparada nos machos e fêmeas de *R. icterica*, após a estabilização das tiras ventriculares ( $n = 10$ ), as cubetas receberam  $10 \mu\text{M}$  de rianodina ( $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_9$  - Sigma). Passados 30 minutos os protocolos experimentais acima descritos (tópico 3.6.2.2) foram repetidos. A rianodina é um alcaloide isolado da planta *Ryania speciosa* (JONES, 1979) que se liga específica e irreversivelmente aos canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Quando utilizada em concentrações micromolares (10 a  $300 \mu\text{M}$ ), provoca uma

diminuição da condutância desses canais, bloqueando-os e inibindo a função do RS como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  (CORONADO et al., 1994).

### **3.5.2.3. Substituição da solução fisiológica convencional pela solução com LiCl**

A fim de comparar a importância funcional do trocador NCX entre os machos e fêmeas de *R. icterica*, após a estabilização das tiras ventriculares ( $n = 10$ ), a solução fisiológica convencional utilizada nas análises do grupo controle foi substituída por uma solução fisiológica de mesma composição, porém sendo o NaCl substituído por LiCl nas mesmas proporções (115 mM) (SMITH; ALLEN, 1988). Em seguida, os protocolos experimentais do item 3.6.2.2 foram repetidos. O lítio é reconhecido como um composto bloqueador dos trocadores NCX. O lítio se liga ao trocador mas não é carregado para o meio intracelular, de modo que o funcionamento do NCX fica bloqueado (SMITH; ALLEN, 1988; MONTEIRO et al., 2016)

### **3.5.2.4. Adição de Ouabaína**

A importância funcional da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase na contratilidade miocárdica de machos e fêmeas de *R. icterica* foi analisada após a adição de ouabaína (3.42 mM) na solução fisiológica das cubetas (resultado numa concentração final na cubeta de  $\sim 1.71 \times 10^{-5}$  M) (BAKER, 1947; PRA; ROSSINI; SEGRE, 1970). Após um período de 15 minutos decorridos da adição da ouabaína, os protocolos experimentais do item 3.6.2.2 foram repetidos. A ouabaína é um glicosídeo cardíaco reconhecido por inibir especificamente a ação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase (OCAMPO; ORREGO, 1981; LIU et al., 2000).

### **3.5.3. Análise dos resultados *in vitro***

Todos os protocolos experimentais foram aplicados para o grupo dos machos e o grupo das fêmeas, em todos os tratamentos (rianodina, lítio e ouabaína) e tiveram um mínimo de 10 para as análises estatísticas. Os registros foram analisados pelo software ANCAD (Solução Integrada Ltda., Brasil). Ao término de cada tratamento, a porção contrátil das tiras ventriculares foi mensurada com o auxílio de um paquímetro. Em seguida as tiras foram retiradas das argolas metálicas e levemente secas em papel de filtro para a

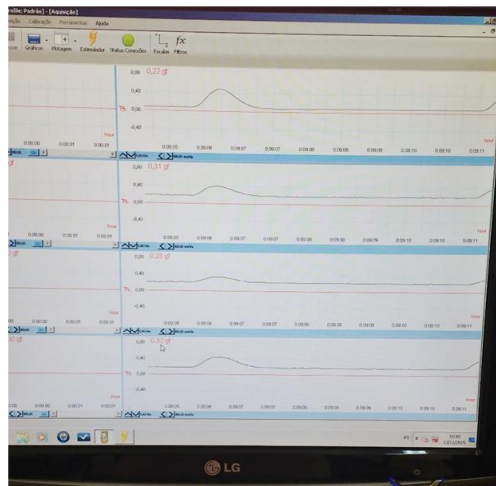


determinação do peso úmido da porção da tira responsável pelas contrações isométricas registradas. Essas medidas foram posteriormente utilizadas no cálculo da área de seção transversal (CSA – “cross-sectional area” - mm<sup>2</sup>), assumindo-se a densidade muscular de 1,06 g.cm<sup>-3</sup> (LAYLAND; KENTISH, 1999).

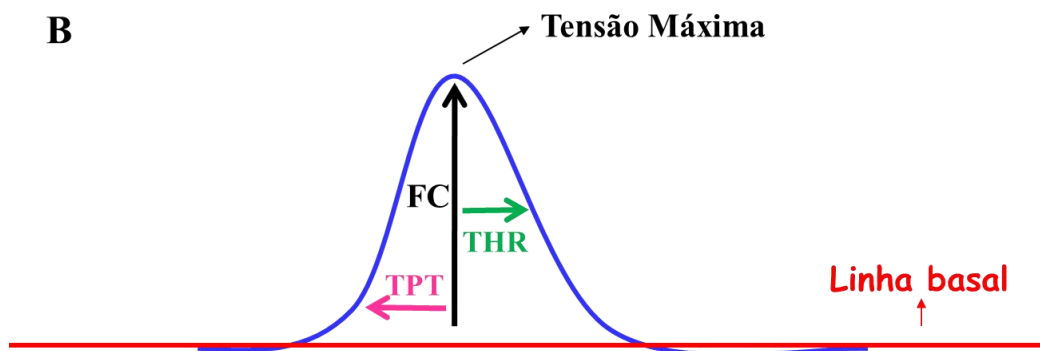
Partindo destes dados, a força de contração de cada tira ventricular (FC - mN.mm<sup>-2</sup>) foi calculada pela diferença entre os valores do pico da tensão isométrica e da tensão de repouso (RT – “resting tension” - mN.mm<sup>-2</sup>) dividida pela CSA da respectiva tira. Os parâmetros tempo-dependentes também foram analisados em todos os protocolos experimentais e expressos em valores absolutos como TPT (“time to peak tension” – ms) e THR (“time to half relaxation” – ms). A figura 13 apresenta a foto de um registro, e um resumo das variáveis analisadas em cada protocolo.

### 13 – Registro da aquisição *in vitro* e os segmentos analisados

A



B



A- Registro das tiras ventriculares B - Variáveis analisadas - FC: força de contração isométrica; TPT - tempo para o pico de tensão; THR - tempo para 50 % do relaxamento.

### 3.6. Western blotting

Amostras de ventrículos cardíacos de *R. icterica* (n = 18: 9 machos e 9 fêmeas) foram separados para as análises de expressão e quantificação das seguintes proteínas cardíacas: Ca<sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), fosfolambano (PLB) e trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX). Os procedimentos de western blotting foram realizados de acordo com (BOCALINI et al., 2012) e (MONTEIRO et al., 2016). Os ventrículos congelados (-80 °C) foram inicialmente homogeneizados em tampão hiperosmótico gelado (250 mM Sacarose, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) e centrifugados a 10.000 g por 40 minutos (4° C). O sobrenadante foi novamente centrifugado (Beckman Coulter-X Ultracentrifuge), desta vez a 100.000 g por 60 minutos a 4° C. Em seguida, o pellet foi ressuspensão em 150 ul de tampão Tris-EDTA (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4). Por fim, o método de BRADFORD, 1976 foi realizado (Quick Start Bradford Protein Assay – Bio-Rad, USA) para a quantificação das proteínas nas amostras.

Após a quantificação, 100 µg de proteínas foram submetidas a um procedimento de eletroforese em tampão de corrida SDS, com gel de acrilamida a 8% para NCX e SERCA, e 12% para PLB. Em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de PVDF em um sistema de transferência com tampão (Bio-Rad). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em solução de leite em pó (Molico) a 5% diluído em tampão Tris adicionado a 0.1% Tween-20, onde permaneceu por 90 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram lavadas em tampão de lavagem e incubadas com seus respectivos anticorpos por 12h a 4° C: anti-NCX1 rabbit policlonal (0.5 ug ml, sc-32881, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), anti-SERCA2 rabbit policlonal (1.0 ug ml, ab91032, Abcam Plc, Cambridge, UK), e anti- PLB rato monoclonal (0.15 ug ml 1, 05-205, Millipore Corporation, Billerica, MA). As membranas foram novamente lavadas em tampão de lavagem, e novamente incubadas, por 2 horas em temperatura ambiente, com seus respectivos anticorpos secundários: goat anti-rabbit IgG (0.2 ug ml, sc-2034, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), e goat anti-mouse IgG (0.34 ug ml 1, AP308A, Millipore Corporation, Billerica, MA). Por fim, as membranas foram lavadas e os imunocomplexos foram detectados através de um kit de substrato conjugado de fosfatase alcalina (Bio-Rad, CA, USA).

Para a quantificação dos níveis de expressão proteica as membranas foram escaneadas e a densidade optica das bandas foram analisadas através do software ImageJ

(ABRAMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004). Os resultados foram expressos em unidade arbitrárias de densidade óptica (U.A.) e normalizados pela expressão de actina das amostras ( $0.5\mu\text{g ml}^{-1}$ , sc-1616, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA).

### **3.7. Análises Estatísticas**

Os valores foram expressos em formato de média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média). As diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância foram consideradas significativas. A fim de comparar os grupos experimentais (machos e fêmeas) no que diz respeito aos dados obtidos nos experimentos *in vivo* (frequência cardíaca basal e taxa metabólica padrão) e aos experimentos moleculares (nível de expressão proteica), utilizou-se o Teste-T de Student não-pareado.

Para os dados obtidos nos experimentos *in vitro*, as comparações entre cada tratamento e seu respectivo grupo controle (rianodina, ouabaína e cloreto de lítio), bem como o efeito de cada tratamento sobre cada grupo experimental (machos e fêmeas) nas diferentes frequências de estimulação (0.2 a 1.4 Hz), utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) One-Way, complementada pelo teste de Dunnett de comparações múltiplas (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Eletrocardiograma: do desenvolvimento da técnica aos registros**

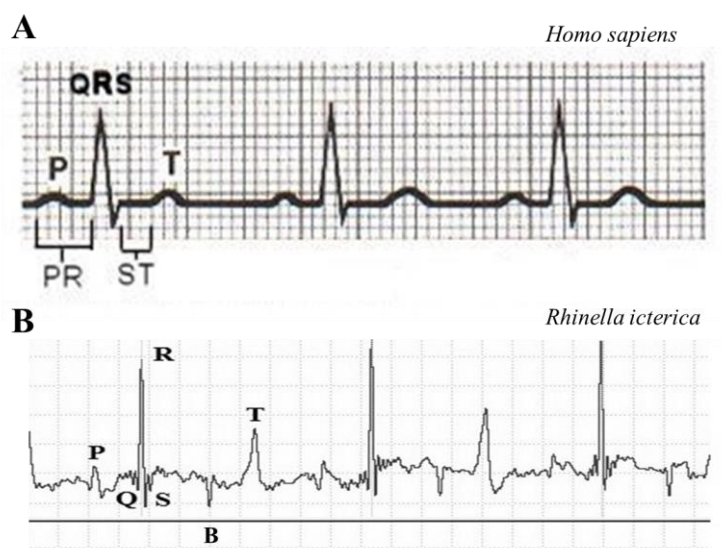
A utilização dos eletrodos de cobre foi bastante efetiva uma vez que a sua alta condutividade permitiu a aquisição de registros com alto grau de detalhamento. Além disso, a utilização de um ambiente não aquoso preveniu a formação de regiões com oxidação dos eletrodos, como frequentemente ocorre em meios aquosos e outros metais.

Um dos desafios enfrentados durante a elaboração deste protocolo foi a adequação das câmaras de contenção dos animais, visto que a frequente movimentação dos mesmos dentro das câmaras gerava grandes ruídos nos registros. Nesse sentido, a fim de criar um ambiente mais adequado, porém ainda confortável para os animais, gazes umedecidas foram inseridas nas laterais da câmara. A adição das gazes limitou brevemente o espaço de movimentação do animal, mantendo-o na posição ótima para a propagação dos impulsos

cardíacos pelos eletrodos. Além disso, a criação de um ambiente mais úmido resultou em uma aparente melhor adaptação e manutenção dos anfíbios durante o período dos registros.

No momento da aquisição dos dados, os registros receberam alguns filtros para eliminar os sinais advindos de ruídos ou de outras regiões teciduais (filtro passa-alto de 1 Hz, filtro de entalhe 60Hz, e filtro passa-baixo de 75Hz). Em seguida, o software Labchart 7 (ADInstruments) foi utilizado para a análise das aquisições. A análise dos dados permitiu observar que embora o coração dos cururus (bem como o de todos os demais anfíbios) possua somente um ventrículo, o seu eletrocardiograma (ECG) parece bastante similar, e compartilha propriedades análogas com o ECG do ser humano, apresentando todos os seus componentes padrões: onda P, complexo QRS e onda T, e um componente adicional, a onda B (no grupo dos machos) (Figura 14).

**FIGURA 14 - Imagem comparativa entre o ECG padrão de humano e de um indivíduo macho do anfíbio *Rhinella icterica***

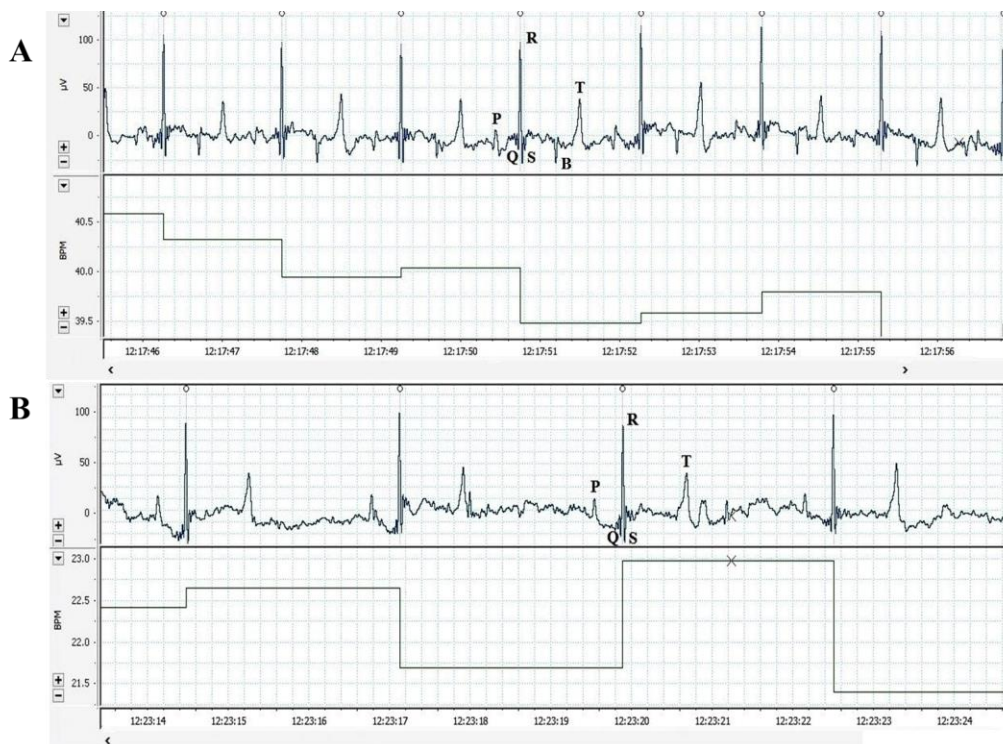


**A** - Registro eletrocardiográfico padrão de humano (AVANCINI A; FAVARETTO, 1997); **B** - Registro eletrocardiográfico de um indivíduo macho de sapo Cururu, *R. icterica*.

Ao comparar os registros obtidos para os machos e para as fêmeas de *R. icterica* foi possível verificar que os componentes do ECG também são semelhantes entre os sexos (Figura 15). No entanto, o ECG das fêmeas não apresentou o registro das ondas “B”. Adicionalmente, a duração da onda P, dos segmentos Q-T, S-T e a própria duração da onda T foi mais longa no grupo das fêmeas. Os demais componentes do ECG não apresentaram

diferenças significativas entre os grupos. O resumo dos valores médios obtidos para cada segmento do ECG para o grupo dos machos e das fêmeas pode ser observados na tabela 1.

**FIGURA 15 - Registros eletrocardiográficos: morfologia e magnitude do ECG de *Rhinella icterica*.**



**A** - Registro eletrocardiográfico de um espécime macho de *Rhinella icterica* a 25 °C, aliado à sua variação da frequência cardíaca (bpm) ao longo do tempo. **B** - Registro eletrocardiográfico de um espécime fêmea de *Rhinella icterica* a 25 °C, aliado à sua variação da frequência cardíaca (bpm) ao longo do tempo.

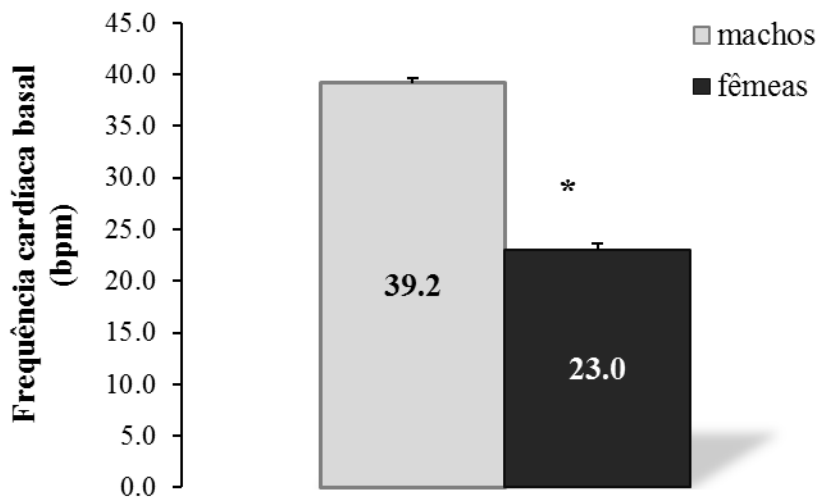
**TABELA 1 - Resumo dos valores médios obtidos para os segmentos padrão do eletrocardiograma de machos e fêmeas de *R. icterica***

<i>Componente</i>	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Duração P (s)</b>	0.098 ± 0.010	0.130 ± 0.009 *
<b>Amplitude P (mV)</b>	0.017 ± 0.003	0.017 ± 0.005
<b>Intervalo P-R (s)</b>	0.348 ± 0.009	0.345 ± 0.012
<b>Duração QRS (s)</b>	0.041 ± 0.008	0.033 ± 0.011
<b>Amplitude QRS (mV)</b>	0.099 ± 0.013	0.091 ± 0.013
<b>Duração Q-T (s)</b>	0.675 ± 0.009	0.853 ± 0.024 *
<b>Duração S-T (s)</b>	0.643 ± 0.014	0.804 ± 0.016 *
<b>Duração T (s)</b>	0.134 ± 0.012	0.201 ± 0.007 *
<b>Amplitude T (mV)</b>	0.050 ± 0.008	0.051 ± 0.010

Os asteriscos (\*) denotam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Por fim, ao comparar as frequências cardíacas basais entre o grupo dos machos e das fêmeas foi possível observar que a frequência cardíaca padrão média ( $f_H = \text{batimentos} \cdot \text{min}^{-1}$ ; bpm;  $n = 10$ ) obtida para os indivíduos machos de *R. icterica* apresentou-se mais elevada ( $39.2 \pm 0.4 \text{ bpm/}$  ou  $0.65\text{Hz}$ ) do que a média dos valores das fêmeas ( $24.0 \pm 0.6 \text{ bpm/}$  ou  $0.38 \text{ Hz}$ ;  $p < 0,05$ ). Esta comparação está representada na figura 16

**FIGURA 16: Valores médios da frequência cardíaca padrão de *R. icterica***



O asterisco (\*) denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

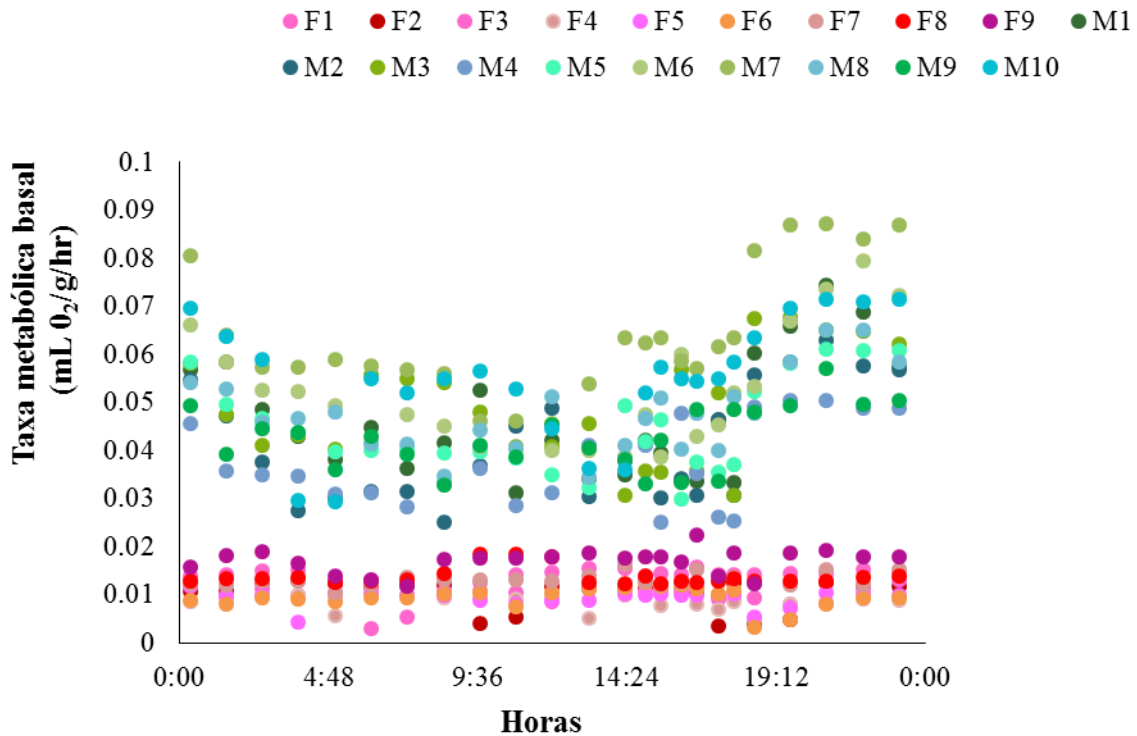
#### 4.2. Taxa metabólica padrão

Com relação aos procedimentos e técnicas adaptadas para a obtenção dos valores de consumo de  $O_2$  dos anfíbios, a utilização de câmaras de tamanhos adequados aos animais foi de grande relevância, uma vez que permitia que o animal se movesse dentro dela, evitando o stress em excesso que um compartimento apertado poderia trazer.

A análise comparada dos registros de consumo de  $O_2$  ( $\text{ml } O_2/\text{g/h}$ ) dos grupos demonstra que os indivíduos machos de *R. icterica* desempenham uma taxa metabólica mais elevada, uma vez que o seu consumo médio de oxigênio apresentou valores mais elevados ( $0.048 \pm 0.002 \text{ ml } O_2/\text{g/h}$ ) do que o grupo das fêmeas ( $0.012 \pm 0.001 \text{ ml } O_2/\text{g/h}$ ). Este padrão elevado de consumo de oxigênio apresentado pelos machos se manteve durante todo o período dos registros (24h), havendo um pico mais aparente no período compreendido entre as 19h e as 24h da noite. No caso das fêmeas, o consumo ao longo do tempo foi mais

constante, não havendo picos aparentes durante o registro. A representação gráfica do consumo médio de O<sub>2</sub> de ambos sexos de *R. icterica* pode ser observada na figura 17.

**FIGURA 17: Gráfico da taxa metabólica padrão desempenhada por machos e fêmeas de *R. icterica* durante 24 horas de registro a 25 °C.**



Os pontos representam os valores da taxa metabólica padrão obtidos a cada 60 minutos de registro, para cada indivíduo integrante do grupo dos machos (M1 a M10) e das fêmeas (F1 a F9).

### 4.3. Efeitos da rianodina, e a expressão de SERCA e PLB

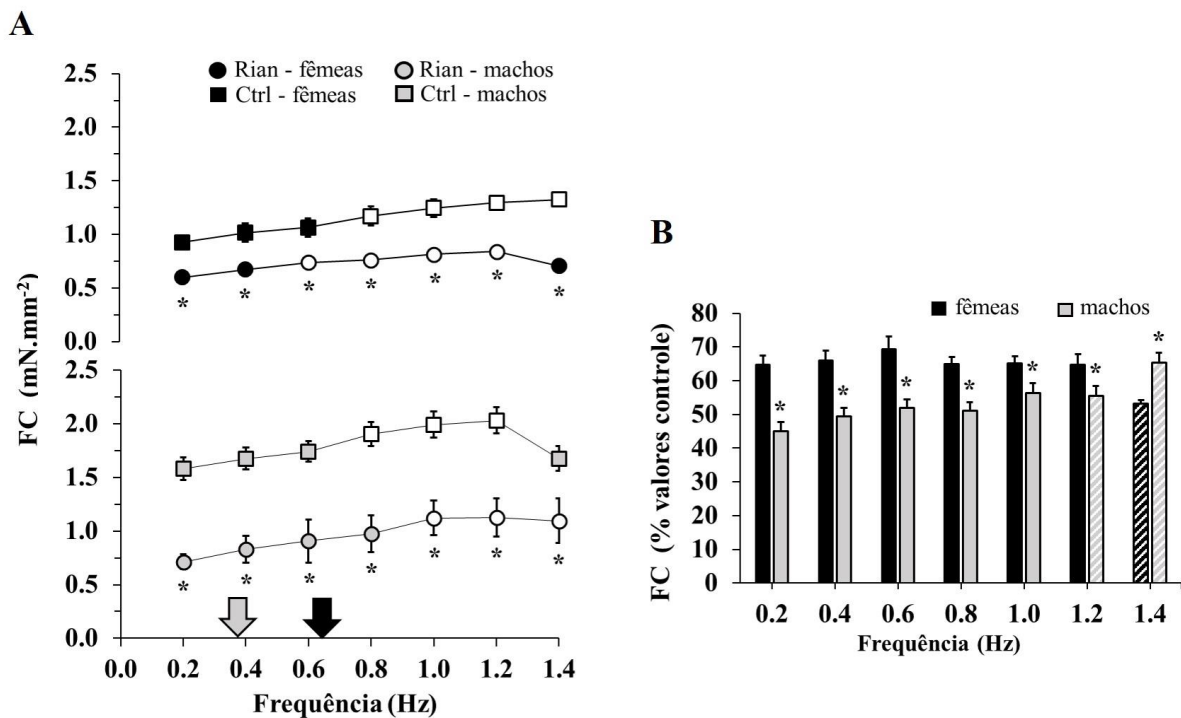
#### 4.3.1. Efeitos da rianodina

Os valores médios da FC ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de machos e fêmeas de *R. icterica*, antes (grupo “Ctrl”,  $n = 10$ ) e após a adição de rianodina (10  $\mu\text{M}$ , grupo “Rian”,  $n = 10$ ), em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (0.2 a 1.4 Hz) estão resumidos na figura 18A. A comparação dos efeitos da rianodina entre os sexos pode ser observada na figura 18B, a qual apresenta os valores de FC normalizados para os machos e fêmeas (os valores estão apresentados como uma porcentagem da FC desenvolvida pelos seus respectivos controles).

A rianodina manteve a relação força-frequência positiva (isto é, a força de contração aumenta à medida que a frequência de estimulação é elevada), a qual já havia sido

observada em seus grupos controle, nas fêmeas (Figura 18A, marcadores pretos) e nos machos (Figura 18A, marcadores cinzas). Entretanto, a rianodina gerou uma redução significativa ( $P < 0.05$ ) nos valores de força de contração, quando comparados aos valores observados em seus controles, em todas as frequências de estimulação, e em ambos sexos de *R. icterica*. Adicionalmente, a frequência de estimulação máxima na qual as tiras ventriculares ainda foram capazes de contrair regularmente foi de 1,2 Hz para ambos sexos, em ambos tratamentos (controle e rianodina). Comparativamente, a rianodina causou uma redução mais evidente nos valores de FC dos indivíduos machos, em todas as frequências (Figura 18B).

**FIGURA 18 - Efeitos da rianodina sobre a força de contração de tiras ventriculares de *R. icterica*.**



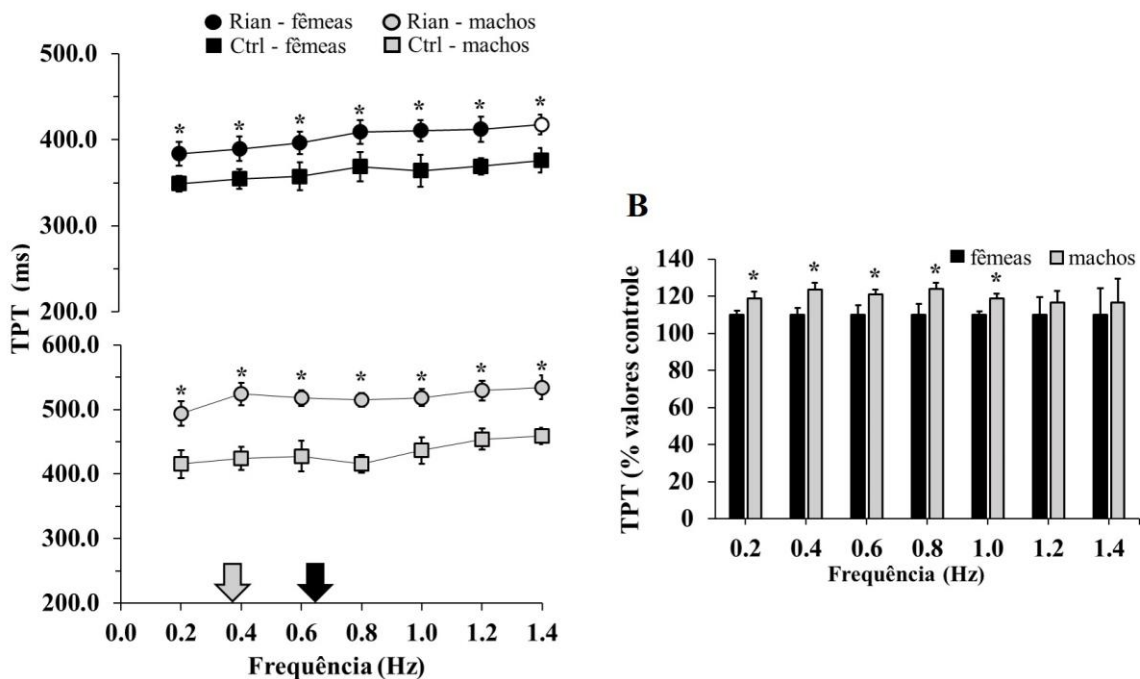
**A** - Efeitos de aumentos na frequência de estimulação sobre a força de contração (FC) desenvolvida por tiras ventriculares de fêmeas (marcadores pretos,  $n = 10$ ) e machos (marcadores cinzas,  $n = 10$ ) de *R. icterica* nos tratamentos controle (Ctrl) e após a adição de rianodina (Rian). Os pontos representam os valores médios de FC  $\pm$  E.P.M. **B** - Efeito comparado da rianodina sobre a força de contração das fêmeas (marcadores pretos,  $n = 10$ ) e dos machos (marcadores cinzas,  $n = 10$ ). As barras representam a força de contração desenvolvida nos tratamentos com rianodina como uma porcentagem dos seus respectivos controles (% Ctrl). Os asteriscos denotam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre Ctrl e Rian em “A”, e entre machos e fêmeas em “B”. Os pontos preenchidos em branco em “A”, e as barras com listras brancas em “B” representam diferenças significativas com relação ao valor observado na frequência de estimulação inicial (0.2 Hz). As setas representam as frequências basais observadas *in vivo*.



Os valores médios de TPT (ms) desenvolvidos pelas tiras ventriculares de machos e fêmeas de *R. icterica* submetidas a tratamentos controle (grupo “Ctrl”, n = 10) e após a adição de rianodina (Rian, n = 10), em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (0.2 a 1.4 Hz) estão resumidos na figura 19A. A comparação dos efeitos da rianodina entre ambos sexos pode ser observada na figura 19B, a qual apresenta os valores de FC normalizados para os machos e fêmeas (os valores estão apresentados como uma porcentagem da FC desenvolvida pelos seus respectivos controles).

A análise dos gráficos demonstra que a rianodina causou um prolongamento no tempo de contração, elevando os valores de TPT ( $P > 0.05$ ) de ambos sexos de *R. icterica*, em todas as frequências de estimulação. Este efeito foi mais evidente nos machos, como pode ser observado na figura 19B, também em todas as frequências de estimulação.

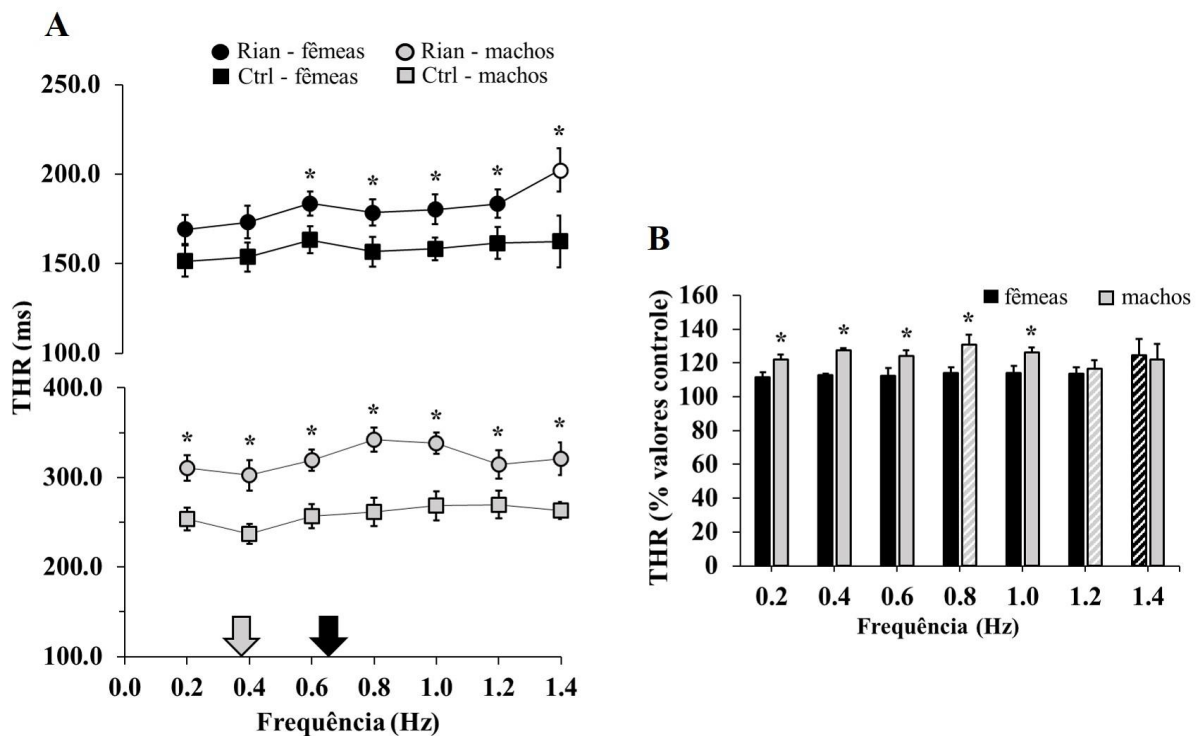
**FIGURA 19 - Efeitos da rianodina sobre o tempo para o pico de tensão em tiras ventriculares de *R. icterica***



**A** - Efeitos de aumentos na frequência de estimulação sobre o tempo para o pico de tensão (TPT) desenvolvido por tiras ventriculares de fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e machos (marcadores cinzas, n = 10) de *R. icterica* nos tratamentos controle (Ctrl) e após a adição de rianodina (Rian). Os pontos representam os valores médios de TPT  $\pm$  E.P.M. **B** - Efeito comparado da rianodina sobre o tempo para o pico de tensão das fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e dos machos (marcadores cinzas, n = 10). As barras representam o TPT desenvolvido nos tratamentos com rianodina como uma porcentagem dos seus respectivos controles (% Ctrl). Os asteriscos denotam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre Ctrl e Rian em “A”, e entre machos e fêmeas em “B”. Os pontos preenchidos em branco em “A”, e as barras com listras em “B” representam diferenças significativas com relação ao valor observado na frequência de estimulação inicial (0.2 Hz). As setas representam as frequências basais observadas *in vivo*.

No que diz respeito ao relaxamento cardíaco também foi observado um aumento nos valores de tempo para 50% do relaxamento (THR) em resposta à rianodina em ambos sexos de *R. icterica* (figura 20A), em toda a faixa de estimulação. Tal prolongamento do tempo de relaxamento foi mais evidente no grupo dos machos, até a frequência de 1 Hz (faixa que ainda inclui as frequências observadas *in vivo*) (figura 20B).

**FIGURA 20 - Efeitos da rianodina sobre o tempo para 50% do relaxamento em tiras ventriculares de *R. icterica***



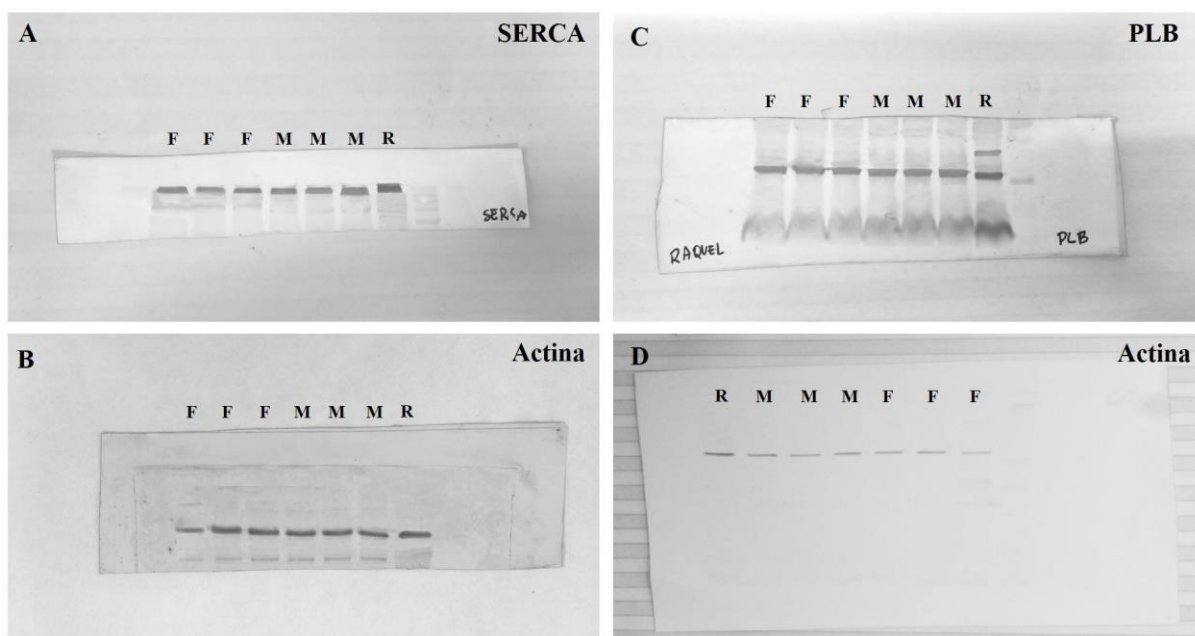
**A** - Efeitos de aumentos na frequência de estimulação sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR) desenvolvido por tiras ventriculares de fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e machos (marcadores cinzas, n = 10) de *R. icterica* nos tratamentos controle (Ctrl) e após a adição de rianodina (Rian). Os pontos representam os valores médios de THR  $\pm$  E.P.M. **B** - Efeito comparado da rianodina sobre o tempo para 50% do relaxamento das fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e dos machos (marcadores cinzas, n = 10). As barras representam o THR desenvolvido nos tratamentos com rianodina como uma porcentagem dos seus respectivos controles (% Ctrl). Os asteriscos denotam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre Ctrl e Rian em “A”, e entre machos e fêmeas em “B”. Os pontos preenchidos em branco em “A”, e as barras com listras em “B” representam diferenças significativas com relação ao valor observado na frequência de estimulação inicial (0.2 Hz). As setas representam as frequências basais observadas *in vivo*.

#### 4.3.2. Expressão das proteínas do retículo sarcoplasmático: SERCA e PLB

As membranas de western blotting referentes à expressão das proteínas SERCA, Actina e PLB nos tecidos cardíacos ventriculares de machos e fêmeas de *R. icterica* podem ser observadas na figura 21. A análise dos níveis de expressão (valores normalizados

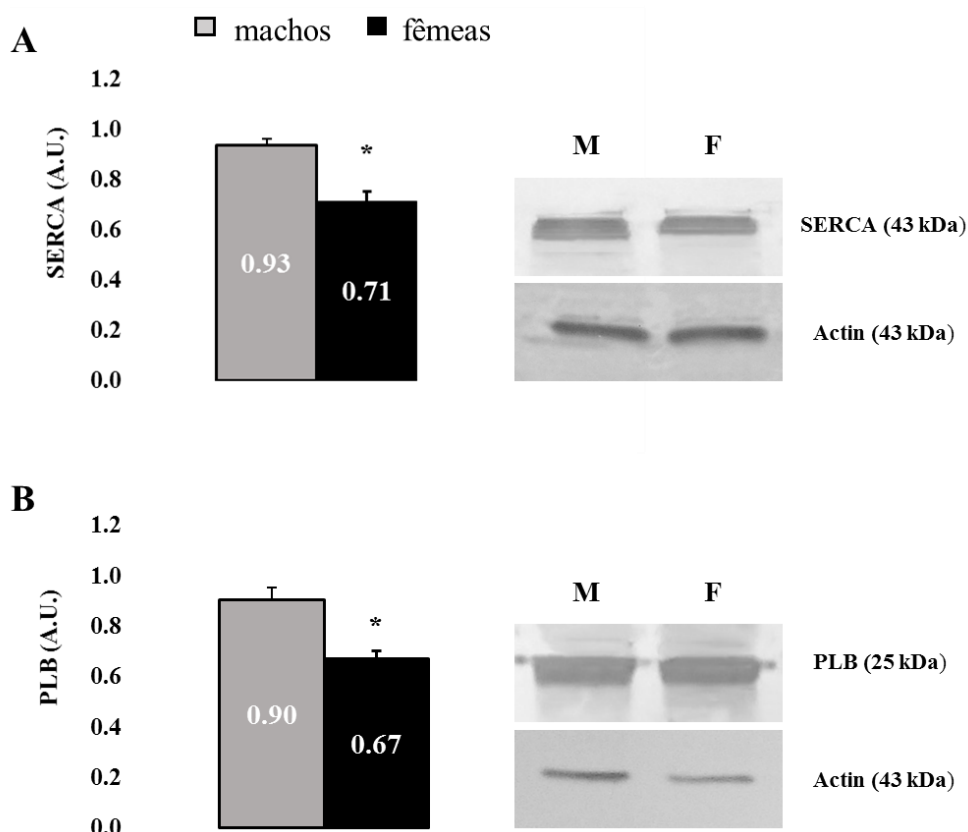
com os níveis endógenos da actina de cada amostra, e apresentados em unidades arbitrárias de densidade óptica – U.A) das proteínas SERCA e PLB, e as suas respectivas bandas de western blotting para os machos (n= 9) e para as fêmeas (n= 9) de *R. icterica* podem ser observados na figura 22 (A: SERCA; B: PLB). A expressão da SERCA foi maior nos machos ( $0.93 \pm 0.03$  U.A.) do que nas fêmeas ( $0.71 \pm 0.04$  U.A.). Em concordância com tais resultados, a expressão de PLB também foi mais elevada nos machos ( $0.90 \pm 0.06$  U.A.) do que nas fêmeas ( $0.67 \pm 0.04$  U.A.).

**Figura 21 - Membranas de western blotting e a expressão das proteínas: SERCA, PLB e Actina.**



**A** - Expressão da SERCA em tecido cardíaco ventricular de Rato Wistar, *Rattus norvegicus* (R), machos (M) e fêmeas (F) do sapo Cururu, *R. icterica*. **B** - Expressão da Actina em tecido cardíaco ventricular de Rato Wistar, *Rattus norvegicus* (R), machos (M) e fêmeas (F) do sapo Cururu, *R. icterica* (mesmas amostras de “A”). **C**: Expressão de PLB em tecido cardíaco ventricular de Rato Wistar, *Rattus norvegicus* (R), machos (M) e fêmeas (F) do sapo Cururu, *R. icterica*. **D**: Expressão da Actina em tecido cardíaco ventricular de Rato Wistar, *Rattus norvegicus* (R), machos (M) e fêmeas (F) do sapo Cururu, *R. icterica* (mesmas amostras de “C”).

**Figura 22 - Níveis de expressão das proteínas SERCA e PLB.**



Nível de expressão da SERCA (U.A.) em tecido cardíaco ventricular de machos (barra cinza; n = 9) e sua respectiva banda representativa juntamente à banda de actina endógena (M) e de fêmeas (barra preta; n = 9) e sua respectiva banda representativa juntamente à banda de actina endógena (F) de sapos *Cururus*, *R. icterica*. Os asteriscos denotam diferença significativa entre machos e fêmeas ( $P < 0.05$ ).

#### 4.4. Efeitos do LiCl, e a expressão de NCX:

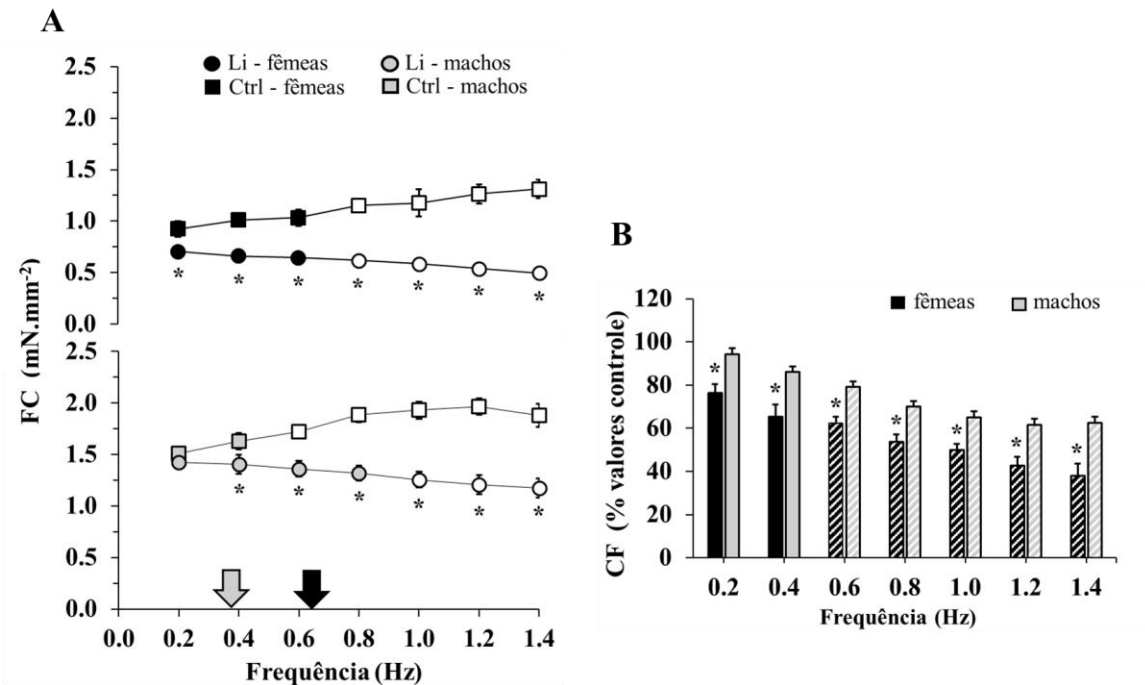
##### 4.4.1. Efeitos do LiCl.

Os valores médios da FC ( $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de machos e fêmeas de *R. icterica*, antes (grupo “Ctrl”, n = 10) e após a substituição da solução fisiológica pela solução contendo LiCl (grupo “Li”, n = 10), em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (0.2 a 1.4 Hz) estão resumidos na figura 23A. A comparação dos efeitos do LiCl entre os sexos pode ser observada na figura 23B, a qual apresenta os valores de FC normalizados para os machos e fêmeas (os valores estão apresentados como uma porcentagem da FC desenvolvida pelos seus respectivos controles).

Na presença de Li Cl, as tiras ventriculares dos machos de *R. icterica* (23A, marcadores cinzas) sofreram uma redução na força de contração ( $P < 0.05$ ) na faixa de frequência entre

0.4 e 1.4 Hz, enquanto que para as fêmeas (Fig. 23A, marcadores pretos) esta redução se estendeu por todas as frequências de estimulação (0.2 a 1.4 Hz). Além disso, a força frequência que era positiva nos tratamentos controle de ambos grupos passou a ser negativa em resposta ao tratamento com o lítio, isto é, à medida que a frequência de estimulação aumentou, a FC se reduziu. A comparação entre os efeitos do LiCl sobre os machos e as fêmeas (figura 23B) demonstrou que a redução do inotropismo em resposta ao LiCl foi mais evidente no grupo das fêmeas, em todas as frequências de estimulação.

**FIGURA 23 - Efeitos do LiCl sobre a força de contração de tiras ventriculares de *R. icterica***



**A** - Efeitos de aumentos na frequência de estimulação sobre a força de contração (FC) desenvolvida por tiras ventriculares de fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e machos (marcadores cinzas, n = 10) de *R. icterica* nos tratamentos controle (Ctrl) e após a substituição da solução fisiológica convencional por outra contendo LiCl (Li). Os pontos representam os valores médios de FC  $\pm$  E.P.M. **B** - Efeito comparado do LiCl sobre a força de contração das fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e dos machos (marcadores cinzas, n = 10) de *R. icterica*. As barras representam a força de contração desenvolvida nos tratamentos com LiCl como uma porcentagem dos seus respectivos controles (% Ctrl). Os asteriscos denotam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre Ctrl e Li em “A”), e entre machos e fêmeas em “B”. Os pontos preenchidos em branco em “A”), e as barras com listras brancas em “B”) representam diferenças significativas com relação ao valor observado na frequência de estimulação inicial (0.2 Hz). As setas representam as frequências basais observadas *in vivo*.

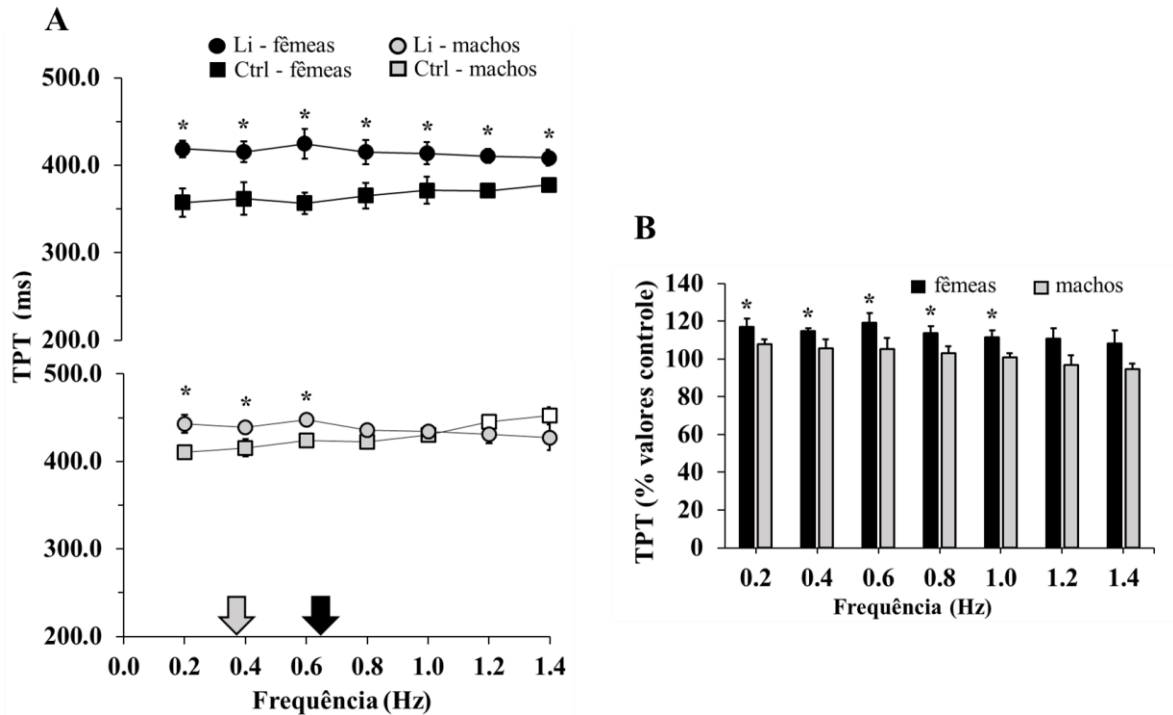
Os valores médios de TPT (ms) desenvolvidos pelas tiras ventriculares de machos e fêmeas de *R. icterica* submetidas a tratamentos controle (grupo “Ctrl”, n = 10) e após a substituição da solução fisiológica convencional por outra solução contendo LiCl (Li, n

= 10), em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (0.2 a 1.4 Hz), estão resumidos na figura 24A. A comparação dos efeitos da rianodina entre ambos sexos pode ser observada na figura 24B, a qual apresenta os valores de FC normalizados para os machos e fêmeas (os valores estão apresentados como uma porcentagem da FC desenvolvida pelos seus respectivos controles).

A análise destes gráficos demonstra que os valores de TPT desenvolvidos pelas tiras ventriculares das fêmeas em resposta ao LiCl foram mais elevados dos que os valores observados no grupo controle ( $P < 0.05$ ), em todas as frequências de estimulação (Fig. 24A, marcadores pretos). Este prolongamento dos tempos de contração também foi observado no grupo dos machos (Fig. 24A, marcadores cinzas), mas somente nas frequências de 0.2 a 0.6 Hz ( $P < 0.05$ ). Tal elevação dos valores de TPT foi mais evidente no grupo das fêmeas (Figura 24B).

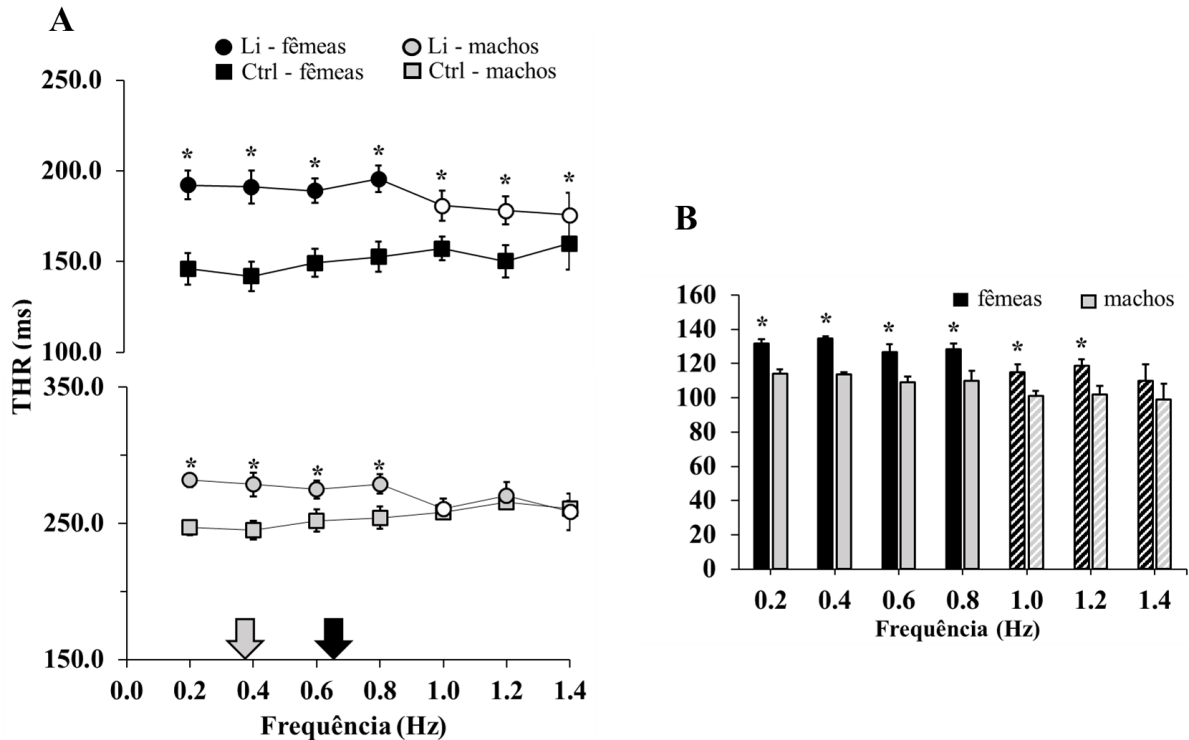
Tal efeito de aumento em resposta ao LiCl foi ainda mais evidente nos parâmetros de relaxamento cardíaco, como pode ser observado pelo elevado THR desenvolvido pelas fêmeas em todas as frequências de estimulação (Fig. 25A, marcadores circulares pretos), e pelos machos na faixa de 0.2 a 0.8 Hz (Fig. 25A, marcadores circulares cinzas). A comparação entre os efeitos do LiCl entre machos e fêmeas demonstra um maior atraso no relaxamento cardíaco das fêmeas, na faixa de frequência de 0.2 a 1.0 Hz, como pode ser observado na figura 25B.

**FIGURA 24 - Efeitos do LiCl sobre o tempo para o pico de tensão de tiras ventriculares de *R. ictérica***



**A** - Efeitos de aumentos na frequência de estimulação sobre o tempo para o pico de tensão (TPT) desenvolvido por tiras ventriculares de fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e machos (marcadores cinzas, n = 10) de *R. ictérica* nos tratamentos controle (Ctrl) e em solução fisiológica com LiCl (Li). Os pontos representam os valores médios de TPT ± E.P.M. **B** - Efeito comparado da rianodina sobre o tempo para o pico de tensão das fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e dos machos (marcadores cinzas, n = 10). As barras representam o TPT desenvolvido nos tratamentos com LiCl como uma porcentagem dos seus respectivos controles (% Ctrl). Os asteriscos denotam diferença significativa (p < 0.05) entre Ctrl e Li em “A”, e entre machos e fêmeas em “B”. Os pontos preenchidos em branco em “A”, e as barras com listras em “B” representam diferenças significativas com relação ao valor observado na frequência de estimulação inicial (0.2 Hz). As setas representam as frequências basais observadas *in vivo*.

**FIGURA 25 - Efeitos do LiCl sobre o tempo para 50% do relaxamento em tiras ventriculares de *R. icterica***



**A** - Efeitos de aumentos na frequência de estimulação sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR) desenvolvido por tiras ventriculares de fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e machos (marcadores cinzas, n = 10) de *R. icterica* nos tratamentos controle (Ctrl) e em solução fisiológica contendo LiCl (Li). Os pontos representam os valores médios de THR  $\pm$  E.P.M. **B** - Efeito comparado do LiCl sobre o tempo para 50% do relaxamento das fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e dos machos (marcadores cinzas, n = 10). As barras representam o THR desenvolvido nos tratamentos com LiCl como uma porcentagem dos seus respectivos controles (% Ctrl). Os asteriscos denotam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre Ctrl e Li em “A”, e entre machos e fêmeas em “B”. Os pontos preenchidos em branco em “A”, e as barras com listras em “B” representam diferenças significativas com relação ao valor observado na frequência de estimulação inicial (0.2 Hz). As setas representam as frequências basais observadas *in vivo*.

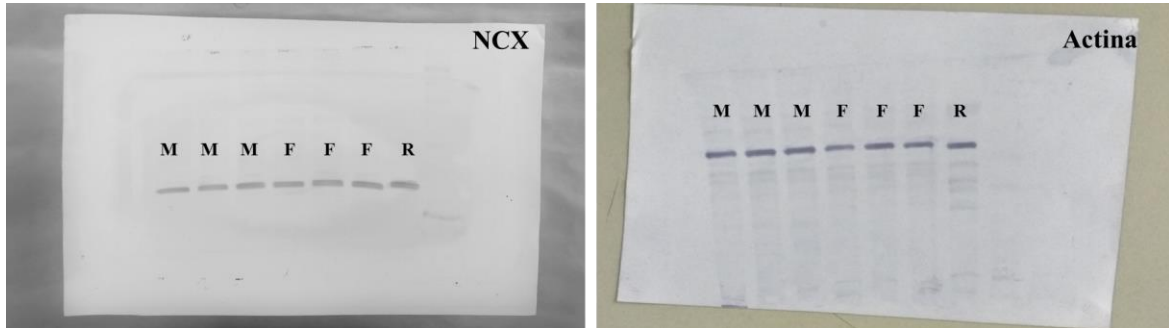
#### 4.4.2. Expressão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX):

As membranas de western blotting referentes à expressão do trocador NCX nos tecidos cardíacos ventriculares de machos e fêmeas de *R. icterica* podem ser observadas na figura 26. A análise dos níveis de expressão (valores normalizados com os níveis endógenos da actina de cada amostra, e apresentados em unidades arbitrárias de densidade óptica – U.A) do NCX e as suas respectivas bandas de western blotting para os machos (n= 9) e para as fêmeas (n= 9) podem ser observados na figura 27. Tais análises demonstraram que a



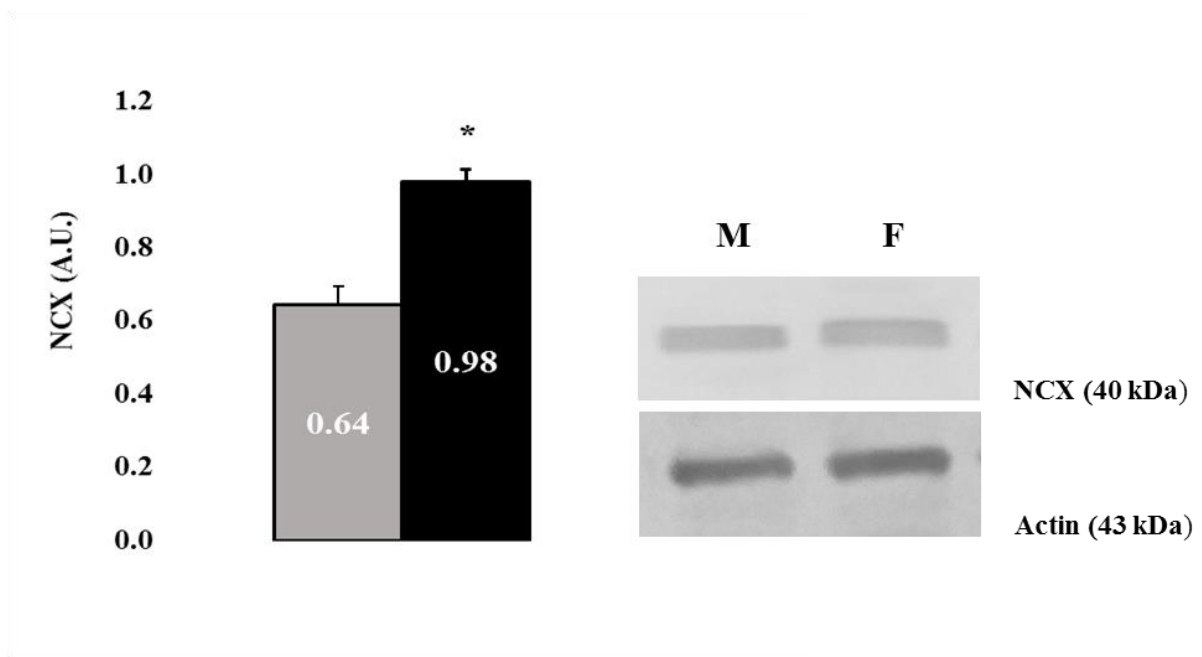
expressão do NCX foi mais elevada nas fêmeas ( $0.98 \pm 0.03$  A.U.) do que nos machos ( $0.64 \pm 0.05$  A.U.).

**FIGURA 26 - Membranas de expressão do trocador NCX.**



**A** - Expressão do NCX em tecido cardíaco ventricular de Rato Wistar, *Rattus norvegicus* (R), fêmeas (F) e machos (M) do sapo Cururu, *R. icterica*. **B** - Expressão da Actina em tecido cardíaco ventricular de Rato Wistar, *Rattus norvegicus* (R), fêmeas (F) e machos (M) do sapo Cururu, *R. icterica* (mesmas amostras de “A”).

**FIGURA 27 - Níveis de expressão do NCX em *R. icterica*.**



Nível de expressão do NCX (U.A.) em tecido cardíaco ventricular de machos (barra cinza;  $n = 9$ ) e sua respectiva banda representativa juntamente à banda de actina endógena (M) e de fêmeas (barra em preto;  $n = 9$ ) e sua respectiva banda representativa juntamente à banda de actina endógena (F) de sapos Cururus, *R. icterica*. Os asteriscos denotam diferença significativa entre machos e fêmeas ( $P < 0.05$ ).

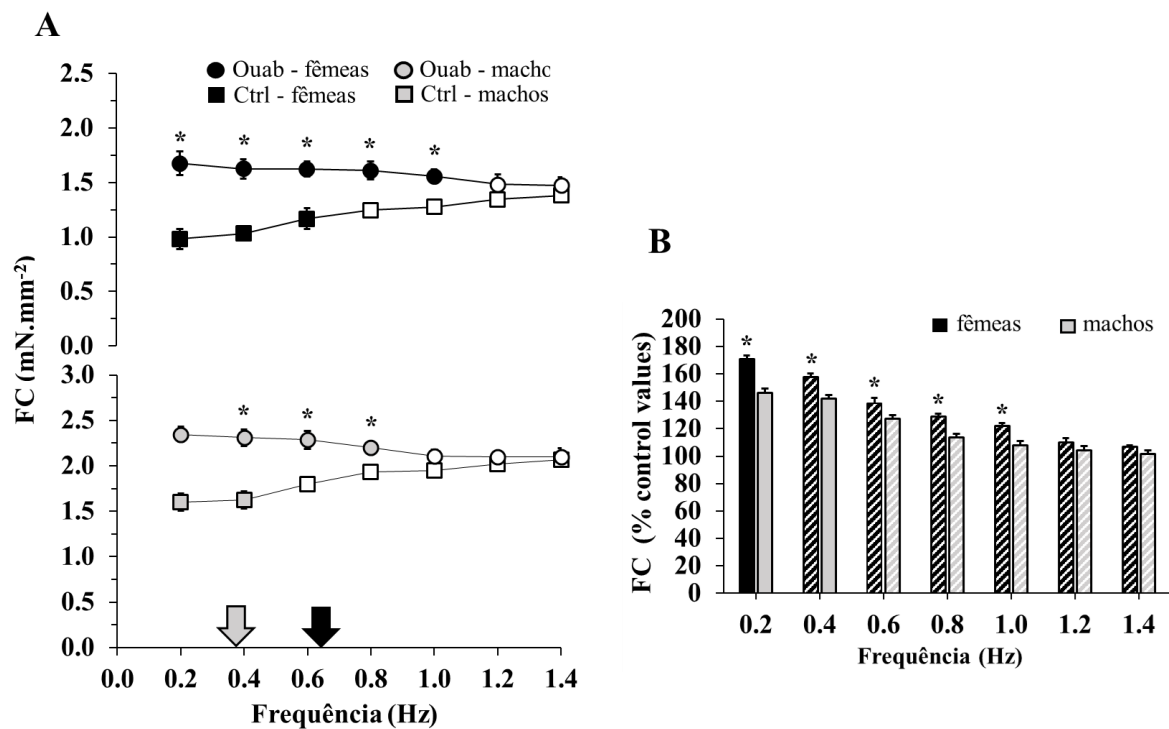
#### 4.5. Efeitos da ouabaína.

Os valores médios da FC ( $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de machos e fêmeas de *R. icterica*, antes (grupo “Ctrl”,  $n = 10$ ) e após a adição de ouabaína

(grupo “Ouab”, n = 10), em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (0.2 a 1.4 Hz) estão resumidos na figura 28A. A comparação dos efeitos da ouabaína entre os sexos pode ser observada na figura 28B, a qual apresenta os valores de FC normalizados para os machos e fêmeas (os valores estão apresentados como uma porcentagem da FC desenvolvida pelos seus respectivos controles).

A adição de ouabaína causou uma elevação na força de contração desenvolvida pelas tiras ventriculares do grupo das fêmeas (P < 0.05) na faixa de frequência de 0.2 a 1.0 Hz (Figura 28A, marcadores pretos). Este efeito de aumento da FC também foi observado para os machos (Figura 28A, marcadores cinzas) na faixa de frequência de 0.2 a 0.8. Curiosamente, a relação força-frequência de ambos grupos (machos e fêmeas) se tornou negativa em resposta ao tratamento com ouabaína (ou seja, à medida que a frequência de estimulação aumentou, a força de contração se reduziu). Além disso, a ouabaína parece atuar de maneira semelhante entre os grupos, uma vez que não houve diferenças significativas entre o grupo dos machos e das fêmeas (Figura 28B).

**FIGURA 28 - Efeitos da ouabaína sobre a força de contração de tiras ventriculares de *R. icterica***

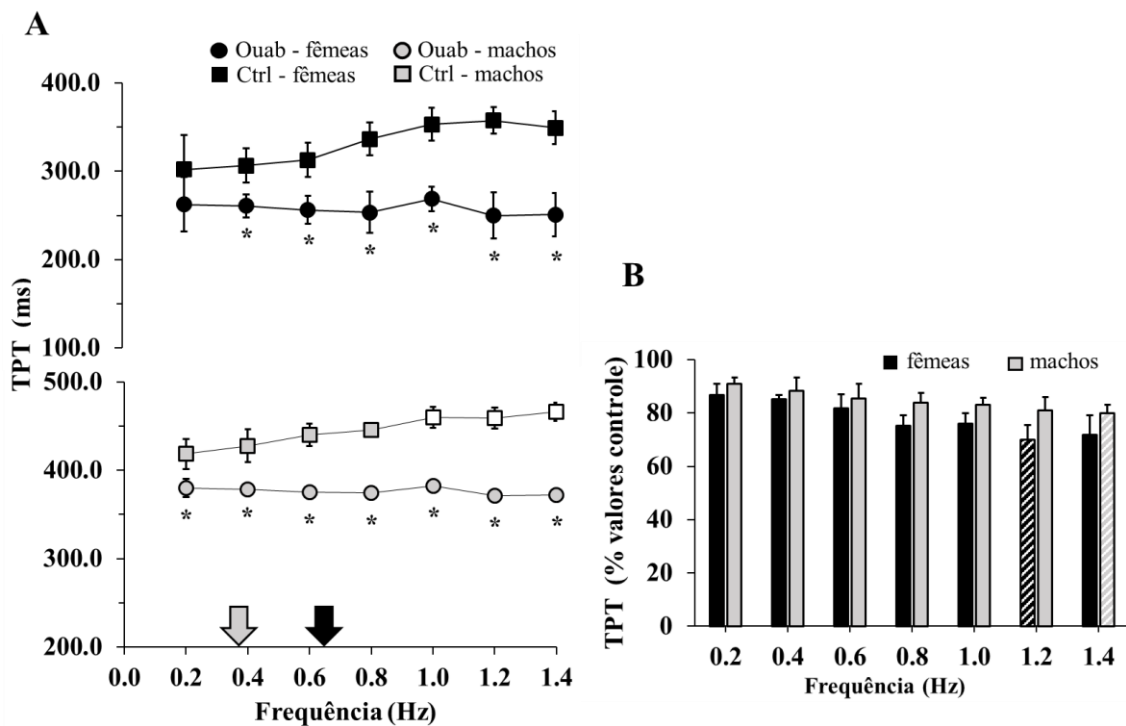


**A** - Efeitos de aumentos na frequência de estimulação sobre a força de contração (FC) desenvolvida por tiras ventriculares de fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e machos (marcadores cinzas, n = 10) de *R. icterica* nos tratamentos controle (Ctrl) e após a adição de ouabaína (Ouab). Os pontos representam os valores médios de FC ± E.P.M. **B** - Efeito comparado da ouabaína sobre a força de contração das fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e dos machos (marcadores cinzas, n = 10) de *R. icterica*. As barras representam a força de contração desenvolvida

nos tratamentos com ouabaína como uma porcentagem dos seus respectivos controles (% Ctrl). Os asteriscos denotam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre Ctrl e Ouab em “A”, e entre machos e fêmeas em “B”. Os pontos preenchidos em branco em “A”, e as barras com listras brancas em “B” representam diferenças significativas com relação ao valor observado na frequência de estimulação inicial (0.2 Hz). As setas representam as frequências basais observadas *in vivo*.

Além dos efeitos de aumento no inotropismo, a ouabaína causou uma redução nos valores de TPT ( $P < 0.05$ ) no grupo das fêmeas (Figura 29A, marcadores pretos) e dos machos (Figura 29A, marcadores cinzas) em toda a faixa das frequências de estimulação. Este efeito foi proporcionalmente semelhante ( $P > 0.05$ ) entre os machos e as fêmeas (figura 28B), como pode ser visto no gráfico de comparação dos sexos.

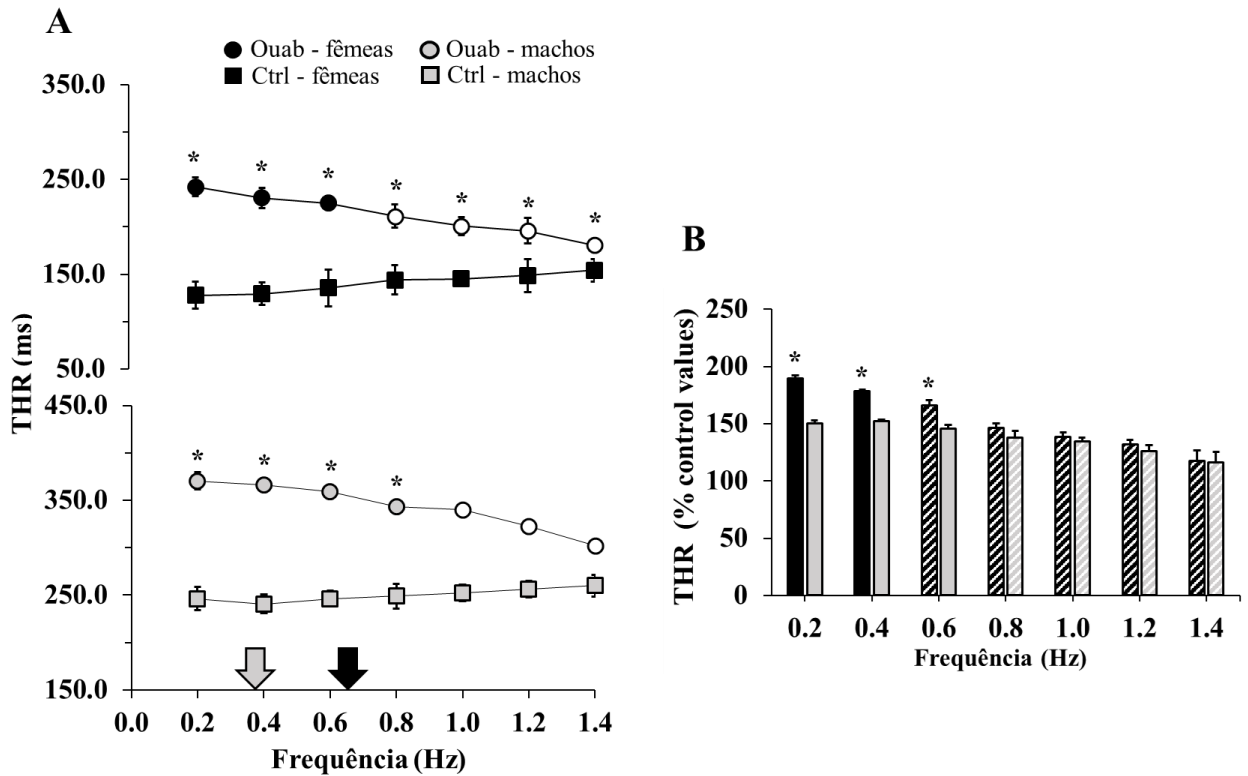
**FIGURA 29 - Efeitos da ouabaína sobre o tempo para o pico de tensão em tiras ventriculares de *R. icterica***



**A** - Efeitos de aumentos na frequência de estimulação sobre o tempo para o pico de tensão (TPT) desenvolvido por tiras ventriculares de fêmeas (marcadores pretos,  $n = 10$ ) e machos (marcadores cinzas,  $n = 10$ ) de *R. icterica* nos tratamentos controle (Ctrl) e após a adição de ouabaína (Ouab). Os pontos representam os valores médios de  $TPT \pm E.P.M.$  **B** - Efeito comparado da rianodina sobre o tempo para o pico de tensão das fêmeas (marcadores pretos,  $n = 10$ ) e dos machos (marcadores cinzas,  $n = 10$ ). As barras representam o TPT desenvolvido nos tratamentos com ouabaína como uma porcentagem dos seus respectivos controles (% Ctrl). Os asteriscos denotam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre Ctrl e Ouab em “A”, e entre machos e fêmeas em “B”. Os pontos preenchidos em branco em “A”, e as barras com listras em “B” representam diferenças significativas com relação ao valor observado na frequência de estimulação inicial (0.2 Hz). As setas representam as frequências basais observadas *in vivo*.

Por outro lado, com relação ao relaxamento cardíaco, houve um atraso nos valores de tempo de relaxamento, como demonstrado pelo aumento dos valores de THR em ambos sexos (Figura 30A). Este atraso foi mais evidente no grupo das fêmeas, nas frequências de 0.2 a 0.6 Hz (Fig. 30B).

**FIGURA 30 - Efeitos da ouabaína sobre o tempo para 50% do relaxamento em tiras ventriculares de *R. icterica***



**A** - Efeitos de aumentos na frequência de estimulação sobre o tempo para 50% do relaxamento (THR) desenvolvido por tiras ventriculares de fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e machos (marcadores cinzas, n = 10) de *R. icterica* nos tratamentos controle (Ctrl) e após a adição de ouabaína (Rian). Os pontos representam os valores médios de THR  $\pm$  E.P.M. **B** - Efeito comparado da rianodina sobre o tempo para 50% do relaxamento das fêmeas (marcadores pretos, n = 10) e dos machos (marcadores cinzas, n = 10). As barras representam o THR desenvolvido nos tratamentos com ouabaína como uma porcentagem dos seus respectivos controles (% Ctrl). Os asteriscos denotam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre Ctrl e Ouab em "A", e entre machos e fêmeas em "B". Os pontos preenchidos em branco em "A", e as barras com listras em "B" representam diferenças significativas com relação ao valor observado na frequência de estimulação inicial (0.2 Hz). As setas representam as frequências basais observadas *in vivo*.

## 5. Discussão

### 5.1.1. EGC em anfíbios: desenvolvimento e execução da nova técnica

Os primeiros experimentos de determinação da frequência cardíaca em anfíbios consistiam na inserção de eletrodos subcutâneos para a obtenção dos registros eletrocardiográficos (MULLEN, 1974; WASSERSUG; PAUL; FEDER, 1981; BURGGREN; FEDER; PINDER, 1983; FEDER, 1983; CHAPOVETSKY; KATZ, 2003; LIU; LI, 2005; SHEMAROVA et al., 2009). Mais recentemente, outras técnicas foram desenvolvidas, envolvendo a canulação de artérias para uma aquisição indireta da frequência cardíaca dos animais (TAYLOR et al., 2014; ZENA; GARGAGLIONI; BUCEGO, 2015). No entanto, tais técnicas podem causar respostas adrenérgicas stress-induzidas nos animais, além de alterações fisiológicas em virtude dos procedimentos anestésicos, prejudicando a obtenção real dos dados basais da frequência cardíaca (WASSERSUG; PAUL; FEDER, 1981; GUÉNETTE; GIROUX; VACHON, 2013; WILLIAMS et al., 2017).

Tentativas de otimizar estes sistemas já foram descritas para peixes, pequenos répteis e anfíbios, no entanto algumas características destes protocolos ainda podem gerar efeitos sobre os resultados (ALTIMIRAS, 2000; AUBRET; TORT; BLANVILLAIN, 2013; GERMER et al., 2015). Em um estudo realizado com peixes, utilizaram malhas metálicas além do princípio de condutividade da água, de modo que as variações dos sinais elétricos dos tecidos dos peixes podiam ser detectados sem a necessidade de implantar eletrodos cirurgicamente (ALTIMIRAS, 2000). Mais recentemente, um sistema wireless foi adaptado para pequenos anfíbios e répteis, utilizando uma malha de tecido contendo sensores espalhados (AUBRET; TORT; BLANVILLAIN, 2013). Embora esta técnica não requeira a inserção cirúrgica de eletrodos, os animais ainda necessitam de anestesia para contenção dos mesmos durante as medições, o que pode gerar efeitos sobre os parâmetros fisiológicos (WILLIAMS et al., 2017). Até que em 2015 um trabalho realizado com pequenos lagartos adaptou os eletrodos de maneira que os mesmos formassem “coleiras circulares”, as quais permaneceriam ao redor do pescoço e do abdômen do animal (GERMER et al., 2015). Tais adaptações foram de grande relevância uma vez que o posicionamento externo dos eletrodos tornava o procedimento menos invasivo, além de não requerer anestesia dos animais. No entanto, ao manter os eletrodos atados ao corpo do animal os próprios autores observaram que havia um certo incômodo nos mesmos, o que ainda poderia gerar respostas estresse-induzidas

(GERMER et al., 2015). Sendo assim, baseando-se em todas essas adaptações, o presente trabalho propôs um novo método, simples e de fácil delineamento, através da utilização de eletrodos externos compostos de cobre. Levando em conta a própria condutividade dos líquidos corporais, o contato direto dos eletrodos com a pele da região ventral dos animais permite que os impulsos bioelétricos gerados no coração dos anfíbios se propague e atinja os eletrodos. Por essa razão, foi possível adquirir registros que, uma vez devidamente tratados pelos filtros adequados, deram origem a boas imagens eletrocardiográficas.

### **5.1.2. Análise dos registros eletrocardiográficos**

Escassas são as análises e descrições eletrocardiográficas realizadas em anfíbios anuros (MULLEN, 1974; AUBRET; TORT; BLANVILLAIN, 2013; KIBLER et al., 2017), sendo que até o momento não existem registros de comparação entre os sexos para nenhuma espécie. Dessa forma, o presente estudo representa uma fonte inédita no que diz respeito à descrição das características do eletrocardiograma e da frequência cardíaca de sexos distintos de anfíbios anuros. Embora os registros de ambos sexos de *R. icterica* compartilhem os mesmos componentes básicos e a mesma morfologia do ECG, algumas peculiaridades intraespecíficas puderam ser observadas em determinados segmentos dos registros, o que pode estar diretamente relacionado com a fisiologia adaptativa de cada gênero sexual.

A princípio, o tempo de duração da onda P foi mais longo no grupo das fêmeas. Isso pode estar relacionado com dois fatores principais: a eficiência da ativação das células do tecido marcapasso, e a velocidade de condução do potencial elétrico pelo tecido atrial (JU; ALLEN, 2000). O disparo espontâneo regular do coração dos anfíbios surge em regiões especializadas conhecidas como tecido marcapasso, que se situam nos seios venosos (JU; ALLEN, 1998). A origem do potencial de ação do marcapasso nos anfíbios depende essencialmente da atuação de canais lentos de  $Ca^{2+}$  e de trocadores NCX; além da possível atuação do retículo sarcoplasmático, dependendo da espécie (JU; ALLEN, 1998, 2000; SHEMAROVA et al., 2009). Desta região o estímulo é propagado para todo o átrio e o conjunto desses eventos gera a onda P no eletrocardiograma (MULLEN, 1974; JU; ALLEN, 2000). Logo, havendo alguma diferença na funcionalidade destes canais entre os machos e fêmeas, o tempo de despolarização atrial pode refletir no eletrocardiograma, resultando em tempos de duração da onda P distintos. Embora não existam dados acerca da expressão dessas proteínas no tecido marcapasso de anfíbios, especialmente no que diz respeito às distinções

sexuais, a análise de expressão da SERCA no tecido ventricular de machos de *R. icterica* deste trabalho demonstrou que o retículo sarcoplasmático dos machos é mais eficiente (como será demonstrado nos próximos tópicos). Caso isso se repita no tecido atrial, podem haver diferenças nos tempos de geração e/ou condução do potencial de ação entre os sexos, o que explicaria a diferença observada nos valores de duração da onda P.

Outro fator que pode causar diferenças nos disparos dos potenciais de ação no marcapasso é a estimulação adrenérgica pela modulação dos canais iônicos localizados na superfície dos miócitos (JU; ALLEN, 1999). Levando em consideração que as respostas adrenérgicas também podem ser distintas entre os sexos, as respostas iônicas de geração e condução do potencial de ação no marcapasso também o serão, o que concorda com os resultados deste trabalho no que diz respeito à duração da onda P.

Embora essas diferenças tenham sido observadas quanto à duração da onda P, não houve diferenças entre os grupos quanto à sua amplitude. Isso demonstra que apesar das possíveis diferenças envolvidas na geração dos estímulos pelo marcapasso e sua condução pelo átrio; ambos sexos de *R. icterica* foram capazes de produzir potenciais bioelétricos de mesma amplitude (voltagens semelhantes). Em outras palavras, durante este primeiro momento do ECG as características elétricas são semelhantes para ambos sexos desta espécie.

O componente seguinte do ECG consiste no intervalo P-R, que corresponde ao tempo de condução atrioventricular (ABEDIN; CONNER, 2008). Se comparados com os ECGs de mamíferos, este intervalo nos anfíbios é relativamente mais longo (CHAPOVETSKY; KATZ, 2003). Isso ocorre pois nos mamíferos a condução do átrio para o ventrículo ocorre através do nodo atrioventricular e seu sistema de células de His-Purkinje (CHAPOVETSKY; KATZ, 2003). No caso dos anfíbios o intervalo mais longo desta fase sugere que a velocidade de condução seja reduzida, uma vez que não possuem um sistema especializado de condução (como o dos mamíferos). Ademais, ao analisar este intervalo nos ECGs não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Assim, o tempo de condução deste segmento é similar entre os machos e fêmeas de *R. icterica*.

A segunda onda presente no ECG de *R. icterica* consiste no complexo QRS. Este componente representa o campo elétrico integrado que é criado pelas células cardíacas excitadas durante a despolarização ventricular (CHAPOVETSKY; KATZ, 2003). A amplitude e a duração deste segmento dependem do número de células diretamente ativas durante o processo de excitação celular (CHAPOVETSKY; KATZ, 2003). Assim, considerando-se que não houve diferença entre a duração dos complexos QRS dos grupos

experimentais, tampouco entre as suas amplitudes, é válido considerar que a magnitude de células ventriculares ativas, bem como a intensidade dos impulsos bioelétricos por elas geradas seja semelhante para ambos sexos de *R. icterica*.

No entanto, a análise do segmento seguinte permitiu observar que o tempo de duração do intervalo Q-T foi mais longo no grupo das fêmeas. Isso indica que os eventos necessários para que ocorra a despolarização e a posterior repolarização do ventrículo ocorrem de forma mais lenta no coração das fêmeas. Estudos realizados com outras espécies de bufonídeos, *Bufo viridis* e *Bufo regularis* (cujos nomes atuais são *Bufoes viridis* e *Sclerophrys regularis*), observaram que a velocidade de condução determina os tempos de excitação e relaxamento do ventrículo. Dessa forma, à medida que a velocidade de condução diminui, a atividade ventricular dura mais tempo (CHAPOVETSKY; KATZ, 2003). Dentre os fatores que podem determinar a velocidade de condução estão a arquitetura do coração e das vias de condução; além da temperatura e da própria taxa metabólica dos animais. Em temperaturas mais baixas os animais sofrem uma redução do metabolismo e das atividades cardíacas, dentre elas, a velocidade de condução dos estímulos ventriculares e consequentemente a frequência cardíaca (CHAPOVETSKY; KATZ, 2003).

No caso da espécie deste estudo, embora não haja alteração da temperatura (que permaneceu a 25 °C), os espécimes fêmeas apresentaram naturalmente uma taxa metabólica mais reduzida (como será discutido posteriormente nos próximos tópicos desta tese), bem como uma frequência cardíaca mais baixa do que os espécimes machos (também será discutido em seguida). Sendo assim, tais características concordam com os maiores tempos de duração do intervalo Q-T, que refletem um maior tempo de condução nas fêmeas e a consequente frequência cardíaca mais lenta. Além disso, não se conhecem descrições acerca da arquitetura cardíaca das vias de condução de machos e fêmeas de anfíbios anuros, podendo portanto também existir padrões diferentes na condução ventricular entre os sexos desta espécie.

Adicionalmente, a ausência de diferenças entre as características do complexo QRS também indica que as distinções entre as velocidades de condução ventricular observadas anteriormente nas medições do segmento Q-T devem-se principalmente aos eventos que sucedem ao QRS, ou seja, a partir do segmento S-T. Para as fêmeas, portanto, a maior duração da condução elétrica no coração concentram-se, em parte, nas fases iniciais da repolarização ventricular e na fase de platô do potencial de ação ventricular, que são mais lentas do que nos machos.



O segmento final do ECG consiste na onda T, que representa a repolarização ventricular. Pesquisas realizadas com outras espécies de bufonídeos, *Bufo raddei* (atual *Strauchbufo raddei*, das regiões norte da Mongólia e China), *Bufo viridis* (atual *Bufoetes viridis*, das regiões norte da Europa) e *Bufo regularis* (atual *Sclerophrys regularis*, africano), observaram um posicionamento inverso da onda T, de modo que a onda ficava virada para baixo no registro (CHAPOVETSKY; KATZ, 2003; LIU; LI, 2005). Segundo estas pesquisas, a direção invertida da onda T nestas espécies refletia possíveis diferenças na arquitetura do coração, especialmente no que diz respeito à pequena funcionalidade do retículo sarcoplasmático nas mesmas (LIU; LI, 2005). Na ausência de um retículo funcional, o cálcio ativador provavelmente teria que se difundir por uma distância maior, o que resultaria em uma rápida perda da polarização da membrana e, conseqüentemente, uma maior duração da onda T.

No caso deste trabalho, os machos e fêmeas de *R. icterica* exibiram a onda T em sua posição convencional, direcionada para cima, o que representa, portanto, uma possível evidência de que o retículo sarcoplasmático apresenta maior funcionalidade nesta espécie. Além disso, a duração da onda T foi maior no grupo das fêmeas, o que novamente reflete a possibilidade de que os machos apresentem uma maior funcionalidade do RS (como será melhor discutido mais adiante).

Por fim, é importante salientar que embora os anfíbios apresentem algumas características análogas aos mamíferos, a estrutura do ECG dos anfíbios difere em diversos pontos devido a presença de estruturas funcionais distintas, além da natureza da condução dos impulsos de uma câmara para a outra (MULLEN, 1974). Dentre estas peculiaridades destaca-se a presença de uma onda adicional: a onda “B”, que denota a despolarização da região do “*bulbus cordis*” (MULLEN, 1974; BURGGREN; FARRELL; LILLYWHITE, 2011). A denominação *bulbus cordis* representa uma região delimitada do coração de anfíbios, peixes (elasmobrânquios) e em alguns lagartos (*Squamata*), que representa uma continuação da via de saída do ventrículo (MULLEN, 1973; BURGGREN; FARRELL; LILLYWHITE, 2011). Parcialmente dividida por uma dobra espiral, a região do *bulbus cordis* é responsável por distribuir o fluxo do sangue em duas direções, e possui grande importância para a contração ventricular pois concentra uma grande quantidade de musculatura cardíaca e elástica (JOHANSEN, 1965; ŠOLC, 2007).

No ECG, estas ondas “B” são raramente registradas em virtude da pequena quantidade relativa de tecido que as gera, e a conseqüente pequena magnitude dos seus

registros no ECG. A onda B ocorre após o complexo QRS, mas é frequentemente obscurecida pela onda T (MULLEN, 1974), e pode estar representada em ambas direções (direcionada para baixo, ou para cima), dependendo da espécie (MULLEN, 1973, 1974).

No caso de *R. icterica*, foi possível observar o registro da onda “B” (direcionada para baixo) somente nos indivíduos machos, sendo mascarada nas fêmeas provavelmente devido à sua menor magnitude, além da possibilidade de ter sido mascarada pelo registro da onda T. Tais resultados demonstram que esta região parece apresentar uma maior funcionalidade nos indivíduos machos que, de fato, apresentam uma função cardíaca mais exigente no que diz respeito às demandas cardíacas, como corroborado pelas demais características do ECG.

## **5.2. Análises in vivo: frequência cardíaca e taxa metabólica basais**

Os corações dos vertebrados funcionam como bombas muito potentes, capazes de gerar uma força mecânica que bombeia o sangue por todo o organismo, distribuindo nutrientes e transportando metabólitos entre os órgãos (LILLYWHITE; ZIPPEL; FARRELL, 1999). Essa bomba funciona todo o tempo, sob pressão e fluxo controlados a fim de suprir os diferentes requerimentos de cada tecido ou órgão. E o controle de todo esse funcionamento depende da regulação do débito cardíaco (LILLYWHITE; ZIPPEL; FARRELL, 1999; WITHERS; HILLMAN, 2001).

Embora diversas características cardíacas sejam comuns a todos os vertebrados, existe uma vasta diversidade funcional entre os organismos devido à ampla gama de demandas comportamentais e ambientais a eles impostas (DRIEDZIC; GESSER, 1994b; BERS, 2001). No caso dos vertebrados ectotérmicos, sabe-se que suas frequências cardíacas são geralmente mais baixas do que aquelas desempenhadas pelos endotérmicos, atingindo um platô máximo de aproximadamente 2 Hz (120 bpm), com algumas exceções (LILLYWHITE; ZIPPEL; FARRELL, 1999). Diversos são os fatores que podem causar variações metabólicas e na frequência cardíaca dos anfíbios, dentre os quais: filogenia, sexo, idade, tamanho corpóreo, temperatura, atividade e metabolismo, níveis de stress, dieta, entre outros fatores endógenos e ambientais (PASANEN; KOSKELA, 1974; LILLYWHITE; ZIPPEL; FARRELL, 1999; CABANAC; CABANAC, 2000; LONGHINI et al., 2017).

De fato, as frequências *in vivo* observadas nos machos e fêmeas de *R. icterica* no presente estudo coincidem com tal assertiva, apresentando valores relativamente baixos

(Tabela 1). Frequências cardíaca basais semelhantes (próximas a 40 bpm, a 25°C) já foram descritas em machos de *Rana temporaria*, uma espécie de atividade e comportamentos sazonais similares à *R. icterica* (ativas durante o verão) (HARRI; TALO, 1975; VINOGRADOVA et al., 1991). Por outro lado, indivíduos de ambos sexos de *Lithobates castesbeianus*, animais de tamanho bastante similar à *R. icterica*, apresentaram frequências cardíacas próximas às observadas nas fêmeas do presente estudo (~28 bpm a 25°C) (HILLMAN et al., 1987; ROCHA; BRANCO, 1998). Tal diferenciação entre as frequências obtidas para os machos e fêmeas de *R. icterica* pode ser um resultado de diversos fatores e peculiaridades intraespecíficas como, por exemplo: o tamanho do indivíduo, o metabolismo, o período reprodutivo, entre outros (LILLYWHITE; ZIPPEL; FARRELL, 1999).

Sabe-se que, para alguns vertebrados, existe uma relação inversa entre a frequência cardíaca e o tamanho (ou peso) corporal do indivíduo, ou seja, animais menores geralmente apresentam frequências cardíacas mais altas (LILLYWHITE; ZIPPEL; FARRELL, 1999; CABANAC; CABANAC, 2000). Essa relação possui algumas exceções, especialmente no que diz respeito às fases larvais de anfíbios. Girinos de anfíbios anuros geralmente apresentam uma relação positiva, onde a frequência cardíaca aumenta quase proporcionalmente ao tamanho dos indivíduos durante a metamorfose ((FRITSCHÉ, 1997).

Nesse sentido, considerando que os indivíduos machos de *R. icterica* (bem como a maioria dos machos da família *Bufo* em geral) são significativamente menores e de menor massa corpórea (dados do presente estudo:  $127.6 \pm 1.6$  g; n = 10) do que as fêmeas (dados do presente estudo:  $230.8 \pm 4.7$  g; n = 10) (KWET; DI-BERNARDO; MANEYRO, 2006; ARANTES et al., 2015), é válido assumir que a relação inversa entre tamanho do corpo e frequência cardíaca (LILLYWHITE; ZIPPEL; FARRELL, 1999; CABANAC; CABANAC, 2000) possa ser um dos fatores determinantes para a frequência cardíaca dessa espécie, conferindo aos machos portanto uma frequência cardíaca maior, e menor às fêmeas.

Outro fator que pode influenciar a frequência cardíaca é o nível de metabolismo do animal. Elevadas taxas energéticas frequentemente demandam altas frequências cardíacas (FARRELL, 1991; FARRELL; JONES, 1992; DRIEDZIC; GESSER, 1994a; LILLYWHITE; ZIPPEL; FARRELL, 1999; LONGHINI et al., 2017). Nesse sentido, os resultados encontrados neste estudo com relação à taxa metabólica dos animais corroboram as assertivas acima, uma vez que os indivíduos machos apresentaram uma maior taxa de consumo de oxigênio, e conseqüentemente, uma maior taxa metabólica, o que explica a maior frequência cardíaca dos mesmos. Em concordância com estes resultados, estudos realizados

em machos de *R. icterica* também já relataram faixas de valores de taxa metabólica semelhantes (MORETTI, 2016), no entanto, não há relatos sobre estes dados para as fêmeas.

O sistema nervoso autônomo modula a frequência cardíaca de todos os vertebrados, influência inibitórias parassimpáticas e excitatórias simpáticas no coração (TAYLOR et al., 2014). O tônus vagal predominante no coração em repouso influencia mudanças instantâneas na frequência cardíaca em um modo “batida-a-batida” em muitos vertebrados. Por outro lado, aumentos na modulação adrenérgica do coração estão relacionados, dentre outros fatores, ao nível de atividade do animal e à sua taxa metabólica (TAYLOR; JORDAN; COOTE, 1999; TAYLOR et al., 2014).

Nesse sentido, algumas características específicas de anfíbios anuros machos conferem a eles naturalmente uma elevada demanda metabólica, como por exemplo, a própria vocalização (FELLERS, 1979; BUCHER; RYAN; BARTHOLOMEW, 1982; TAIGEN; POUGH, 1983, 1985). Estudos demonstram que o custo energético da vocalização em anuros machos (com a finalidade de atrair fêmeas) pode ser muito alto, alcançando valores até 25 vezes maiores do que suas taxas metabólicas durante o repouso (BUCHER; RYAN; BARTHOLOMEW, 1982; TAIGEN, THEODORE L.; WELLS, KENTWOOD; MARSH, 1985). Tal demanda energética tão grande decorre da contração sustentada e intensa de grandes músculos do tronco do animal, os quais criam uma pressão na cavidade celômica necessária para a produção do som (MARTIN; GANS, 1972; GANS, 1973), além da alta atividade de enzimas catabólicas (TAIGEN; POUGH, 1985). Assim, sabendo-se que os machos de *R. icterica* aumentam substancialmente a sua atividade de vocalização durante a época reprodutiva (período no qual os experimentos foram realizados) (LIMA et al., 2010; FORTI, 2009), e presumivelmente também aumentam suas demandas energéticas e cardíacas (FELLERS, 1979; BUCHER; RYAN; BARTHOLOMEW, 1982; TAIGEN, THEODORE L.; WELLS, KENTWOOD; MARSH, 1985; TAIGEN; POUGH, 1985), é válido considerar que os valores mais elevados de frequência cardíaca observados para os machos também possam ser um resultado desse comportamento.

Outro fator de alto custo metabólico para anuros machos é o desempenho muscular e locomotor desenvolvido em atividades como o forrageio, disputa entre machos, defesa de território e construção de ninhos (SEYMOUR, 1973; BENNETT; LICHT, 1974; BUCHER; RYAN; BARTHOLOMEW, 1982; IRSCHICK; GARLAND, 2001; PERRY et al., 2004; ANDRADE et al., 2005; MORETTI et al., 2014). Os membros machos da família *Bufonidae* são caracterizados por realizarem longos períodos de locomoção contínua na busca

ativa de presas ou de parceiras sexuais em seus ambientes naturais (TOFT, 1980, 1981; WALTON, 1988; POUGH; TAIGEN, 1990). Todas essas atividades requerem altas taxas metabólicas, possivelmente elevando também as suas demandas cardíacas (TOFT, 1980; WALTON, 1988; POUGH; TAIGEN, 1990).

No caso das fêmeas, é sabido que entre os bufonídeos, aloca-se grande parte de seus recursos energéticos especificamente para o crescimento e para a reprodução, em detrimento de outras atividades custosas como a locomoção, canto, forrageio, dentre outras supracitadas, as quais são restritas aos machos (TOFT, 1980; LARDNER; LOMAN, 2003; ARANTES et al., 2015). Além disso, seu nível de atividade diário e noturno são relativamente mais baixos, restringindo-se a deslocamentos mais curtos, e hábitos preferivelmente de “senta-e-espera” para alimentação (LARDNER; LOMAN, 2003; DOS SANTOS; AMATO; BORGES-MARTINS, 2013; ARANTES et al., 2015). Assim, uma vez dotadas de um comportamento menos ativo, as fêmeas podem apresentar demandas fisiológicas cardíacas proporcionais ao seu metabolismo, o que concorda com os valores mais baixos de frequência cardíaca basal e de taxa metabólica padrão observadas no presente estudo. Nesse sentido, podemos concluir a partir da análise precedente que a frequência basal de *R. icterica* varia entre machos e fêmeas, o que parece estar intrinsecamente relacionado ao nível de atividade de cada gênero, e, conseqüentemente, a uma modulação autonômica dos tônus vagal e adrenérgico dos mesmos.

No entanto, o conhecimento das taxas metabólicas e das frequências cardíacas unicamente não refletem na íntegra o potencial de ajustes cardiovasculares dessa espécie, uma vez que ajustes no volume sistólico também podem desempenhar um papel importante na regulação do débito cardíaco (FARRELL et al., 1996). Sendo assim, outras peculiaridades no inotropismo cardíaco de machos e fêmeas de *R. icterica* podem vir a ser observadas, oriundas de diferenças intraespecíficas quanto ao acoplamento E-C e à expressão e funcionalidade das proteínas cardíacas. Daí a importância de comparar-se as respostas inotrópicas de sexos distintos de uma mesma espécie, mediante o estudo *in vitro* da força de contração isométrica desenvolvida por tiras ventriculares e da análise da expressão proteica, os quais serão descritos a seguir.

### 5.3. Funcionalidade do retículo sarcoplasmático: análises *in vitro* e moleculares

#### 5.3.1. Experimentos com Rianodina

A força de contração desenvolvida pela musculatura cardíaca é diretamente influenciada por variações na frequência e na regularidade dos estímulos (HAJDU, 1969). A relação força-frequência, por sua vez, envolve diversos mecanismos relacionados à tomada e ao estoque de cálcio (WOHLFART; NOBLE, 1982; ROCHA; RANTIN; KALININ, 2007), e a importância individual de cada componente desse processo pode variar de forma inter e intraespecífica (DRIEDZIC; GESSER; DRIEDZIC, 1988; ROCHA; RANTIN; KALININ, 2007).

Na maioria dos mamíferos (KOCH-WESER; BLINKS, 1963), em tartarugas (DRIEDZIC; GESSER, 1985) e em alguns peixes (DRIEDZIC; GESSER, 1985; DRIEDZIC; GESSER; DRIEDZIC, 1988; KEEN; FARREL, 1992; SHIELS et al., 1999; SHIELS; FARRELL, 2000; COSTA et al., 2004), aumentos consecutivos na frequência de estimulação, dentro da faixa fisiológica, geram elevações na força de contração cardíaca. Essa tendência é conhecida como “relação força-frequência positiva” ou “escadaria de Bowditch” (a força de contração aumenta em resposta a um aumento na frequência de estimulação) (DRIEDZIC; GESSER, 1985; DRIEDZIC; GESSER; DRIEDZIC, 1988). No caso dos anfíbios, essa relação positiva também já foi reportada em algumas espécies de anfíbios anuros adultos (HAJDU, 1969; DRIEDZIC; GESSER, 1985; SUBRAMANI et al., 2005) e em girinos (DALMEDICO et al., 2014; COSTA et al., 2015; SALLA et al., 2015, 2016), sendo atualmente também observada nos tratamentos controle dos machos e fêmeas de *R. icterica* deste trabalho. A adição de rianodina às tiras ventriculares de *R. icterica* deste estudo não alterou a relação força-frequência, que se manteve positiva em ambos grupos experimentais (machos e fêmeas), concordando com outros estudos onde a rianodina também manteve uma relação força-frequência positiva em peixes (KEEN; FARREL, 1992; COSTA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2016) e em anfíbios (SUBRAMANI et al., 2005).

Por outro lado, a força de contração desenvolvida pelas tiras ventriculares dos machos e das fêmeas de *R. icterica* sofreu uma grande redução em seus valores quando expostas à rianodina, assim como também já demonstrado em diversos estudos com peixes (HOVE-MADSEN; GESSER, 1989; HOVE-MADSEN, 1992; KEEN; FARREL, 1992; MÖLLER-NIELSEN; GESSER, 1992; TIBBITS, 1996; SHIELS et al., 1999; SHIELS;

FARRELL, 2000; ANELLI et al., 2004; COSTA et al., 2004; RIVAROLI; RANTIN; KALININ, 2006; ROCHA; RANTIN; KALININ, 2007) e em um estudo com anfíbios, realizado em *Euphlyctis hexadactylus*, popularmente conhecidas como “rãs indianas verdes” (SUBRAMANI et al., 2005). De fato, a rianodina é uma ferramenta farmacológica que tem sido amplamente utilizada para verificar a importância funcional do RS como fornecedor de  $Ca^{2+}$ , por ser conhecida por deprimir a geração de força em diferentes graus, dependendo da espécie, tecido e estágio de desenvolvimento ontogenético (BERS, 1985; WIBO et al., 1991). Essa ação redutora do inotropismo deve-se à afinidade desse alcaloide de se ligar aos canais de cálcio (canais de rianodina) do retículo sarcoplasmático, inibindo a liberação de cálcio que seria mobilizado pelas miofibrilas durante a contração (DRIEDZIC; GESSER; DRIEDZIC, 1988; KEEN; FARREL, 1992; MILL et al., 1998; BERS, 2001; RIVAROLI; RANTIN; KALININ, 2006). Sendo assim, a redução inotrópica ocorrida em *R. icterica* pelo uso da rianodina representa uma evidência fisiológica de que o retículo sarcoplasmático possui grande importância na contração cardíaca de machos e de fêmeas dessa espécie.

A princípio, os estudos que se dedicaram a verificar a importância e a funcionalidade do retículo sarcoplasmático no coração dos anfíbios foram realizados com as espécies *Rana temporaria* (NIEDERGERKE, 1963; NIEDERGERKE; PAGE, 1981; TIJSKENS; MEISSNER; FRANZINI-ARMSTRONG, 2003) e *Rana pipiens* (CIOFALO, 1973; KAVALER, 1974; ANDERSON; HIRSCH; KAVALER, 1977; BOSSEN; SOMMER, 1984; TUNSTALL; CHAPMANT, 1994). De baixa atividade metabólica e adaptados às regiões de frio intenso europeu (ST-PIERRE; BRAND; BOUTILIER, 2000; ULTSCH; REESE; STEWART, 2004), tais espécies apresentaram uma participação pouco relevante do RS na contratilidade cardíaca, o qual foi a princípio considerado como pouco desenvolvido e esparso nos anfíbios (NIEDERGERKE, 1963; CIOFALO, 1973; KAVALER, 1974; NIEDERGERKE; PAGE, 1981; BOSSEN; SOMMER, 1984; TIJSKENS; MEISSNER; FRANZINI-ARMSTRONG, 2003). Para estes animais, o complexo excitação-contração deveria portanto depender majoritariamente do fluxo transsarcolemal de cálcio (KAVALER, 1974; TIJSKENS; MEISSNER; FRANZINI-ARMSTRONG, 2003). Além disso, o simples fato de que os anfíbios apresentam miócitos de pequenas dimensões e miofibrilas de disposição mais periférica para facilitar a contração (PAGE; NIEDERGERKE, 1972; BOSSEN; SOMMER, 1984; BRANDT et al., 1998), já sugeria que o RS não teria um papel predominante na ativação das contrações cardíacas.

Entretanto, estudos posteriores com outra espécie mais ativa e de ambiente

tropical (*Euphlyctis hexadactylus* – antiga *Rana hexadactyla*) verificaram uma maior funcionalidade do RS na contração cardíaca (SUBRAMANI; VIJAYANAND; THARION, 2002; SUBRAMANI et al., 2005), contrastando os trabalhos anteriores, e demonstrando a possibilidade de que essa organela tenha uma maior relevância funcional dentro de alguns grupos de anfíbios. Nesta mesma direção, o presente trabalho apresenta a redução inotrópica das tiras cardíacas com o uso da rianodina como uma evidência fisiológica de que o retículo sarcoplasmático possui grande participação na contração cardíaca de machos e de fêmeas de *Rhinella icterica*, atuando como uma importante fonte intracelular de cálcio. Este trabalho consiste, portanto, no primeiro relato de uma espécie de anuro brasileira que possui esta organela funcional no tecido cardíaco e, por tanto, pode apresentar diversas características e adaptações importantes ao ambiente tropical, o que pode ter diversas implicações ecológicas e evolutivas para a espécie em questão.

Ainda se tratando dos efeitos da rianodina, diversas pesquisas indicam um efeito negativo mais pronunciado sobre a força de contração de indivíduos mais ativos, como por exemplo alguns peixes teleósteos como a truta, *Oncorhynchus mykiss*, o atum, *Katsuwonus pelamis* (KEEN; FARREL, 1992; TIBBITS, 1996; SHIELS et al., 1999), a cavala, *Scomber japonicus* (SHIELS; FARRELL, 2000) e o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (ANELLI et al., 2004). O que sugere a possibilidade de uma forte correlação entre o nível de atividade dos organismos e a participação do retículo sarcoplasmático no acoplamento E-C de algumas espécies. No caso de *Rhinella icterica*, esta mesma correlação pôde ser observada de forma intraespecífica, uma vez que os indivíduos machos, mais ativos, apresentaram um maior efeito da rianodina sobre a força de contração cardíaca quando comparado às fêmeas, menos ativas. Sendo assim, o retículo sarcoplasmático dos machos de *R. icterica* parece desempenhar um papel mais importante como fonte de cálcio para o acoplamento E-C do que para as fêmeas.

Considerando os parâmetros tempo-dependentes, os valores de TPT e THR obtidos para as tiras ventriculares do grupo controle dos indivíduos machos foram maiores do que os valores do grupo controle das fêmeas, em concordância com os seus respectivos valores de força de contração. Dotadas de uma força de contração mais elevada, as tiras ventriculares dos indivíduos machos requerem um tempo maior para o término do ciclo contração-relaxamento, seja pelo maior requerimento de cálcio e/ou pelo funcionamento dos canais e bombas ocorrer de forma diferenciada com relação às fêmeas.

Após a adição de rianodina, o decréscimo do inotropismo em resposta à



rianodina foi acompanhado por um aumento da duração do ciclo contração/relaxamento de ambos grupos experimentais (machos e fêmeas), conforme comprovado pelos aumentos do TPT e THR. Tais alterações na dinâmica cardíaca indicam que, além de ser relevante para o fornecimento de cálcio e o consequente tempo para a contração, o RS de *R. icterica* também contribui significativamente para a diminuição de cálcio citosólico e, conseqüentemente, para o relaxamento cardíaco. Dessa forma, em virtude da atuação da rianodina, o RS fica impossibilitado de reestocar o cálcio citosólico, retardando o relaxamento cardíaco. Esse aumento nos parâmetros tempo-dependentes foi mais acentuado no grupo dos indivíduos machos (figuras YC e YD), o que indica uma maior dependência do retículo sarcoplasmático dos indivíduos machos no que diz respeito à dinâmica cardíaca.

### **5.3.2. Western blotting e a expressão das proteínas cardíacas: SERCA e PLB**

A SERCA representa uma proteína cardíaca de grande importância do RS, auxiliando o relaxamento cardíaco de acordo com as demandas do organismo (BERS, 2001). Designada molecularmente como “SERCA2a”, esta isoforma ocorre entre os vertebrados em tecidos de contração lenta (musculatura lisa) e em tecidos cardíacos com retículo sarcoplasmático funcional (MACLENNAN et al., 1985; TULLIS; BLOCK, 1996). Nesse sentido, corroborando os experimentos *in vitro* anteriormente discutidos, a expressão da SERCA pelo western blotting confirma a funcionalidade do retículo sarcoplasmático em ambos sexos de *R. icterica*.

Sabe-se que os níveis de expressão proteica estão altamente associados à funcionalidade das proteínas no organismo, ou seja, quanto maior a expressão de uma proteína, maior a sua atividade (ALBERTS et al., 2002). Segundo PERIASAMY; KALYANASUNDARAM, (2007), a expressão e a existência de isoformas da proteína SERCA em vertebrados pode variar de acordo com metabolismo do animal e suas demandas cardíacas, podendo ser alteradas inclusive em resposta a variações ambientais. Além disso, sabe-se que os níveis de expressão da SERCA determinam a capacidade de estoque de cálcio do RS, o que está intimamente ligado à relevância dessa organela para os mecanismos de contração e relaxamento cardíacos (MURPHY et al., 2009). Sendo assim, a diferença nos níveis de expressão da SERCA entre machos e fêmeas de *R. icterica* indica que a sua expressão pode estar relacionada à dependência do retículo sarcoplasmático por cada gênero, sendo mais expressa nos indivíduos machos e conferindo a eles, portanto, uma maior

funcionalidade do RS para a função cardíaca. Nesse sentido, a maior expressão da proteína SERCA nos indivíduos machos corrobora os estudos *in vitro* onde a rianodina também indicou uma aparente maior dependência do RS no que diz respeito à função cardíaca, especialmente nos mecanismos de relaxamento, o que parece adequado à sua maior demanda cardíaca e metabólica (também já discutidos anteriormente neste trabalho). As fêmeas por sua vez, apresentaram menores níveis de expressão da SERCA, também concordando com a suposta menor dependência do RS, como demonstrado nos experimentos *in vitro* e *in vivo* em comparação aos machos.

Assim como na fisiologia, os estudos que buscaram elucidar o papel do retículo sarcoplasmático nos anfíbios através de ferramentas moleculares também são escassos (VILSEN; ANDERSEN, 1992; DODE et al., 2001; FALCKE et al., 2003; CERRA; IMBROGNO, 2012). Os primeiros registros acerca da expressão da SERCA em anfíbios anuros dedicaram-se a descrever dados somente sobre a musculatura esquelética de *Rana sylvatica* (DODE et al., 2001) e *Rana esculenta* (VILSEN; ANDERSEN, 1992), e sobre oócitos de *Xenopus laevis* (FALCKE et al., 2003). E as primeiras conclusões moleculares com relação à funcionalidade do RS na função cardíaca dos anfíbios vieram através do estudo dos genes codificadores da SERCA (VILSEN; ANDERSEN, 1992). Ao estudarem diversos tecidos, dentre eles o cardíaco, VILSEN e ANDERSEN, (1992) não detectaram o RNAm responsável por codificar a SERCA em *Pelophylax nigromaculatus* (antiga “*Rana esculenta*”). Tal descoberta fomentou a conclusão generalizada de que os anfíbios não possuíam um RS funcional no coração, a qual já tinha sido teorizada em alguns estudos fisiológicos com espécies de baixo metabolismo (NIEDERGERKE, 1963; KAVALER, 1974; BOSSEN; SOMMER, 1984; TIJSKENS; MEISSNER; FRANZINI-ARMSTRONG, 2003).

Estudos fisiológicos posteriores (SUBRAMANI; VIJAYANAND; THARION, 2002; SUBRAMANI et al., 2005), demonstraram que algumas espécies podem apresentar demandas cardíacas maiores e um RS mais funcional. No entanto, estes estudos concentraram-se em metodologias fisiológicas, não havendo, até o momento, quaisquer confirmações moleculares publicadas de que a SERCA estaria realmente expressa no tecido cardíaco de anfíbios anuros. Este estudo consiste, portanto, no primeiro relato a utilizar o western blotting como evidência molecular de que o RS está presente e pode ser significativamente funcional para a função cardíaca de algumas espécies de anfíbios anuros, notadamente machos e fêmeas de *R. icterica*.

É importante salientar ainda que o funcionamento e o controle do retículo sarcoplasmático não dependem somente da SERCA, mas de um complexo formado pelas proteínas SECA2a e a sua proteína regulatória associada, o fosfolambano (PLB) (SIMMERMAN; JONES, 1998; CERRA; IMBROGNO, 2012). Durante o ciclo cardíaco, a alternância da fosforilação/desfosforilação do PLB é que determina o estado de atividade ou inatividade da SERCA2a, e consequentemente a recaptação de cálcio pelo RS (CERRA; IMBROGNO, 2012).

Evidências da expressão de PLB já foram relatadas nos tecidos cardíacos de mamíferos (CERRA; IMBROGNO, 2012), em algumas espécies de aves e peixes (WILL et al., 1983, 1985) e somente em uma espécie de anfíbio; *Pelophylax bedriagae* (MAZZA et al., 2008). Mantida durante a evolução em todos esses grupos de vertebrados, e dotada de várias sequências homólogas preservadas, tal presença ubíqua de PLB claramente indica uma grande importância evolutiva como regulador cardíaco crucial entre os vertebrados (WILL et al., 1985; CERRA; IMBROGNO, 2012).

Assim como para a SERCA, este estudo também representa o primeiro registro molecular via western blotting de que a proteína PLB encontra-se expressa no tecido ventricular cardíaco de anfíbios machos e fêmeas de *R. icterica*, sendo molecularmente semelhantes ao modelo de expressão proposto para os mamíferos (25kDa). Por ser uma proteína associada à SERCA, sua expressão foi correspondente aos achados anteriores deste trabalho, sendo os machos, portanto, portadores de um maior nível de expressão do que as fêmeas. Tais resultados, aliados às análises de THR com rianodina, sustentam a hipótese de que o retículo sarcoplasmático possui uma maior contribuição no relaxamento cardíaco dos indivíduos machos de *R. icterica* do que nas fêmeas, o que complementa as análises anteriores acerca da expressão da SERCA.

## **5.4. Experimentos com LiCl**

### **5.4.1. Experimentos in vitro: efeitos do LiCl**

O cálcio extracelular é essencial à contração miocárdica (BERS, 2001). E o seu influxo pela SL ocorre através dos trocadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) (atuando em seu modo reverso) e de canais voltagem-dependentes tipo L (lentos) (BERS; CHRISTENSES;

NGUYEN, 1988; MIKAMI et al., 1989; ROMANIN; KARLSSOM; SCHINDLER, 1992; NAKAI et al., 1997). Estas proteínas cardíacas desempenham um papel crítico na regulação da contratilidade cardíaca pois, juntamente com o RS, fornecem os íons cálcio para a ativação dos miofilamentos durante o acoplamento E-C (BERS; CHRISTENSES; NGUYEN, 1988; MIKAMI et al., 1989; ROMANIN; KARLSSOM; SCHINDLER, 1992; NAKAI et al., 1997).

O lítio é comumente utilizado como agente bloqueador, uma vez que se liga ao trocador NCX sem ser carregado para o meio intracelular (LUTTGAU; NIEDERGERKE, 1958; NIEDERGERKE, 1963; BAKER et al., 1969; KAWATA, 1979; SMITH; ALLEN, 1988; MONTEIRO et al., 2016), bloqueando assim a função do trocador na célula. Além disso, o lítio consegue passar pelos canais de sódio permitindo a geração do potencial de ação, no entanto, a excitabilidade se reduz gradativamente visto que o lítio não consegue ser removido da célula pelas bombas de sódio (CARMELIET, 1964; SMITH; ALLEN, 1988).

Nesse sentido, uma vez bloqueado pelo lítio, o influxo de cálcio extracelular pelo NCX fica prejudicado, resultando em uma possível resposta inotrópica negativa. De fato, as tiras ventriculares dos machos e fêmeas de *R. icterica* submetidas ao tratamento com LiCl apresentaram uma redução significativa em seus valores de força de contração, como demonstrado nos resultados deste trabalho. Isso indica uma grande relevância do NCX como fonte extracelular de cálcio para a contração cardíaca de ambos sexos dessa espécie. Estudos realizados com peixes (MONTEIRO et al., 2016) e outras espécies de anuros, *Rana temporaria* (LUTTGAU; NIEDERGERKE, 1958) e *Lithobates catesbeianus* (KAWATA, 1979) já demonstraram uma redução do inotropismo em resposta ao lítio, indicando também uma alta funcionalidade deste trocador como participante na contratilidade cardíaca destas espécies.

Embora tal efeito inotrópico negativo tenha ocorrido em ambos grupos experimentais, o efeito do lítio foi mais acentuado no grupo dos indivíduos fêmeas. Isso indica que o NCX pode exercer um papel de maior relevância nas fêmeas como fonte de cálcio extracelular para a contração cardíaca. De fato, como demonstrado anteriormente, as fêmeas apresentaram uma menor funcionalidade do RS (comparativamente aos machos) para a contração cardíaca. Dessa forma, é compreensível que o NCX assumira uma maior funcionalidade nesse sentido, a fim de compensar e suprir adequadamente as demandas cardíacas de cálcio das fêmeas.

Adicionalmente, ao reduzir a força de contração cardíaca, o tratamento com LiCl também gerou uma inversão da relação força-frequência de ambos grupos experimentais, a qual se tornou negativa para os machos e para as fêmeas. Esta inversão provavelmente ocorreu devido ao bloqueio do NCX promovido pelo LiCl. De acordo com SUBRAMANI et al. (2005), a relação força-frequência cardíaca nos anfíbios é diretamente dependente da direção de atuação do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  durante a diástole. Assim, se o NCX atua na forma cálcio-extrusiva (modo “normal”) durante a diástole, a relação força-frequência tende a ser positiva. No entanto, caso exista alguma intervenção que resulte no bloqueio e/ou na reversão do modo de operação do trocador, o qual passaria a atuar de forma sódio-extrusiva (modo reverso), a relação força-frequência torna-se negativa (SUBRAMANI; VIJAYANAND; THARION, 2002; PETROFF; PALOMEQUE; MATTIAZZI, 2003; SUBRAMANI et al., 2005). Ou seja, o fluxo do cálcio diastólico é determinante para a relação força-frequência (SUBRAMANI et al., 2005). Por essa razão, ao intervir no fluxo de cálcio diastólico (pelo bloqueio do NCX), o LiCl gerou uma reversão da relação força-frequência em ambos grupos experimentais, tornando-as negativas. Resultados semelhantes já foram observados em mamíferos (SMITH; ALLEN, 1988), em peixes (MONTEIRO et al., 2016), e anfíbios (KAWATA, 1979).

Em concordância com estes resultados, o tempo para o pico de tensão do grupo das fêmeas sofreu um prolongamento significativo em resposta ao tratamento com lítio em todas as frequências de estimulação, ao passo que, no grupo dos machos somente as frequências de 0.2 a 0.6 (incluindo a sua frequência basal *in vivo*) sofreram tal prolongamento. Resultados semelhantes já foram observados em experimentos realizados com *L. catesbeianus*, onde o tratamento de LiCl também gerou um prolongamento dos parâmetros de tempo de contração e relaxamento cardíacos (KAWATA, 1979).

Estes resultados também podem ser explicados devido ao bloqueio do NCX pelo lítio, prejudicando parte do influxo de cálcio extracelular e possivelmente retardando o tempo de contração. Embora os canais L também participem como potenciais fontes de cálcio extracelular (HOVE-MADSEN et al., 2000), seu funcionamento é lento e a magnitude do influxo de cálcio varia entre as espécies (BERS, 1985). Dessa forma, com o NCX bloqueado, a entrada transarcolemal de cálcio pelos canais L pode não ser suficiente para suprir as demandas de cálcio extracelular requeridas pelo músculo das tiras ventriculares gerando, portanto, um prolongamento do tempo para o pico de tensão.

Adicionalmente, sabe-se que o cálcio liberado do RS constitui-se na fonte principal deste íon para a contração do coração de diversas espécies (WIER, 1990; GWATHMEY; MORGAN, 1991; MCCALL; ORCHARD, 1991; BASSANI; BASSANI; BERS, 1992, 1994; KLAUTZ; BAAN; TEITEL, 1997). No caso dos anfíbios deste estudo, embora funcional (como já demonstrado e discutido anteriormente), o RS de *R. icterica* também não foi suficiente unicamente para manter o mesmo aporte de cálcio requerido pela dinâmica cardíaca na ausência do NCX, retardando a contração. Isso indica que, embora o RS de *R. icterica* aparentemente possua uma grande relevância como estoque e fonte de cálcio para esta espécie, o seu funcionamento durante o relaxamento depende significativamente da colaboração do NCX para que a retirada de cálcio do citoplasma seja realizada de forma mais eficiente.

Assim como já observado para os mecanismos envolvidos na contração, as tiras ventriculares das fêmeas possuem uma maior dependência do NCX no que diz respeito ao relaxamento cardíaco, quando comparadas aos machos (que aparentemente possuem um RS mais funcional e atuante como fonte de reserva de cálcio). Por essa razão o LiCl gerou um prolongamento mais acentuado no THR do grupo das fêmeas.

#### **5.4.2. Western blotting e a expressão do trocador NCX**

Uma vez membro da família de proteínas cátion/ $\text{Ca}^{2+}$  de antiporte, o NCX desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase de cálcio em uma grande variedade de tipos celulares (KOMURO et al., 1992; LEE; YU; LYTTON, 1994; MARSHALL et al., 2005). Devido à sua emergência evolucionária recente, presume-se que todos os metazoários devam expressar alguma isoforma deste trocador (MARSHALL et al., 2005). Até o momento, a maioria dos genes estudados e sequenciados de NCX são de tecido muscular esquelético de origem mamífera (MARSHALL et al., 2005), no entanto diversos ortólogos do NCX também foram caracterizados nos vertebrados mais basais, como os peixes (XUE et al., 1999), e anfíbios (IWATA et al., 1996).

No caso dos anfíbios anuros em especial, considerando as pressuposições iniciais de que os mesmos não apresentavam um retículo sarcoplasmático funcional no coração, o NCX sempre foi destacado por sua função particularmente proeminente na função

cardíaca, atuando supostamente como o principal mecanismo de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  para o exterior celular (IWATA et al., 1996; SHUBA et al., 1998; BLAUSTEIN; LEDERER, 1999).

Neste trabalho, o retículo sarcoplasmático apresentou um papel de significativa importância funcional para os machos e fêmeas de *R. icterica*, como já observado anteriormente nos experimentos *in vitro* com rianodina e pela expressão da SERCA e de PLB. No entanto, o NCX apresentou maiores níveis de expressão no grupo das fêmeas de *R. icterica*, o que indica que, para elas, este trocador parece desempenhar grande funcionalidade na função cardíaca, o que também corrobora os experimentos *in vitro* com lítio deste estudo. O NCX, portanto, atua como uma das principais vias de extrusão de cálcio em *R. icterica*, especialmente nos indivíduos fêmeas, as quais dependem em menor escala do RS, quando comparadas aos machos. Em concordância com estes resultados, os indivíduos machos apresentaram um menor nível de expressão do NCX, corroborando a hipótese de que o retículo sarcoplasmático seja mais importante na função cardíaca deste gênero em *R. icterica*.

## 5.5. Experimentos com Ouabaína

A  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase é uma proteína integral de membrana que ocorre nas células da maioria dos eucariontes (BONTING; CARAVAGGIO; HAWKINS, 1962; LINGREL; KUNTZWEILER, 1994). Atuando como um sistema de transporte ativo, a  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase é responsável pela manutenção dos gradientes de sódio e potássio através da membrana plasmática, utilizando a energia da hidrólise de uma molécula de ATP (AKERA, T., BRODY, 1978; LINGREL; KUNTZWEILER, 1994; HORISBERGER, 2004). Para cada 3 íons sódio transportados para fora da célula, 2 íons potássio são translocados para dentro, produzindo um gradiente químico e elétrico na membrana (SKOU; ESMANN, 1992; LINGREL; KUNTZWEILER, 1994). Tal gradiente é essencial para a manutenção do potencial de ação e o retorno ao potencial de repouso das células (AKERA, T., BRODY, 1978; LINGREL; KUNTZWEILER, 1994; HORISBERGER, 2004).

Sabe-se que a  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase é especificamente inibida pela ação de glicosídeos cardíacos, como a ouabaína, a qual tem sido utilizada há anos, desde tratamentos clínicos até estudos fisiológicos de função cardíaca (GLITSCH; REUTER; SCHOLZ, 1970; NAYLERT, 1973; AKERA, T., BRODY, 1978; OCAMPO; ORREGO, 1981; FUJINO; FUJINO, 1982; SKOU; ESMANN, 1992; LINGREL; KUNTZWEILER, 1994; LIU et al., 2000).

A inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase pela ouabaína promove um acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  dentro da célula (AKERA, T., BRODY, 1978), retardando o seu retorno ao potencial de repouso e potencialmente favorecendo a entrada de cálcio e a consequente liberação de cálcio (cálcio-induzida) pelo retículo sarcoplasmático e a contração (ARESE; BOSIA; ROSSINI, 1969; NAYLERT, 1973; FUJINO; FUJINO, 1982). Além disso, o acúmulo de sódio intracelular também pode induzir o trocador NCX a atuar em seu modo reverso, levando o  $\text{Na}^+$  para fora da célula e, em troca, trazendo  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular (MARÍN; REDONDO, 1999; GEERING, 2006). Ao atuar em seu modo reverso, o NCX contribui com o aumento do inotropismo (MARÍN; REDONDO, 1999), além de gerar a reversão da relação força-frequência do músculo cardíaco (SUBRAMANI; VIJAYANAND; THARION, 2002; PETROFF; PALOMEQUE; MATTIAZZI, 2003; SUBRAMANI et al., 2005), como já citado anteriormente nos experimentos com LiCl deste estudo.

De fato, as tiras ventriculares de machos e fêmeas de *R. icterica* deste estudo sofreram um aumento em seus valores de força de contração em resposta ao tratamento com ouabaína. Tal incremento inotrópico também foi acompanhado pela reversão da relação força-frequência, a qual passou a ser negativa em resposta ao tratamento com ouabaína em ambos grupos experimentais (machos e fêmeas). Tais resultados indicam que a  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase possui grande relevância no que diz respeito à manutenção da contração cardíaca desta espécie, para ambos sexos estudados. Em concordância com a discussão precedente, a inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase e os consequentes ajustes celulares explicam o acréscimo do inotropismo e a inversão da relação força-frequência observada para *R. icterica* em resposta à ouabaína. Estudos realizados em anuros já relataram resultados inotrópicos positivos semelhantes em resposta a tratamentos *in vitro* com ouabaína em *Rana temporaria* (ARESE; BOSIA; ROSSINI, 1969; PRA; ROSSINI; SEGRE, 1970), *Rana japonica* (FUJINO, 1974) e em *Lithobates pipiens* (THOMAS JR., 1960; OCAMPO; ORREGO, 1981) também corroborando os resultados deste trabalho.



## 6. CONCLUSÃO

- Como previsto nas hipóteses deste trabalho, a utilização de eletrodos externos facilitou a aquisição da frequência cardíaca de *R. icterica*, gerando registros que possibilitaram a análise das características da condução dos estímulos bioelétricos pelo coração desta espécie, reduzindo os procedimentos potencialmente invasivos;
- As características do eletrocardiograma obtido para cada sexo estão em concordância com as respectivas taxas metabólicas, o que demonstra uma forte ligação entre o nível metabólico e função cardíaca de cada sexo nesta espécie.
- O retículo sarcoplasmático desempenha um papel de grande importância como fonte de cálcio intracelular em ambos sexos de *R. icterica*, sendo ainda mais importantes para os machos que, de fato, apresentam demandas cardíacas mais elevadas. Tais resultados são de extrema importância pois além de refutar o conceito genérico de que os anfíbios não possuíam um retículo funcional, ainda demonstram que essa funcionalidade pode estar fortemente relacionada com os padrões metabólicos nos anfíbios, e podem variar entre os sexos.
- O trocador de membrana NCX também apresentou um grande papel no influxo de cálcio extracelular, bem como no efluxo durante o relaxamento, em especial para os espécimes fêmeas, que apresentam um retículo sarcoplasmático funcional, porém em menor extensão do que os machos. As fêmeas de *R. icterica* apresentam uma maior dependência do trocador NCX como fonte de cálcio extracelular, o que concorda com as observações sobre o RS, uma vez que as fêmeas não requerem mecanismos cardíacos altamente eficientes, de acordo com suas demandas cardíacas e metabólicas mais reduzidas
- A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase também apresentou determinada importância na manutenção da contração miocárdica de *R. icterica*, e especialmente nos mecanismos de relaxamento, sendo sua funcionalidade aparentemente semelhante para ambos sexos nesta espécie.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABEDIN, Z.; CONNER, R. **ECG Interpretation. The Self-assessment approach**. 2 ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2008.
- ABRAMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36–42, 2004. Disponível em: <<https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/204900>>. Acesso em: maio 2014.
- AKERA, T., BRODY, T. The Role of Na,K-ATPase in the Action of Digitalis Inotropic. **Pharmacological Reviews**, v. 29, n. 3, p. 187–221, 1978. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/29/3/187>>. Acesso em jun. 2014.
- ALAM, M. S.; IGAWA, T.; KHAN, M. M. R.; et al. Genetic divergence and evolutionary relationships in six species of genera *Hoplobatrachus* and *Euphlyctis* (*Amphibia: Anura*) from Bangladesh and other Asian countries revealed by mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 2, p. 515–527, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790301954>>. Acesso em jun. 2014.
- ALFORD, R. A.; RICHARDS, S. J. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 30, p. 133–165, 1999. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ecolsys.30.1.133>>. Acesso em: abr. 2015.
- ALLEN, D. G.; KENTISH, J. C. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 17, p. 821-840, 1985. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022282885800973>>.
- ALTIMIRAS, J. Non-invasive recording of heart rate and ventilation rate in rainbow trout during rest and swimming. Fish go wireless! **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 1, p. 197–209, 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1006/jfbi.2000.1299>>. Acesso em ago. 2014.
- ANDERSON, T. W.; HIRSCH, C.; KAVALER, F. Mechanism of activation of contraction in frog ventricular muscle. **Circulation Research**, v. 41, n. 4, p. 472–480, 1977. Disponível em:

<<http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.41.4.472>>. Acesso em: jan. 2015.

ANDRADE, D. V.; CRUZ-NETO, A. P.; ABE, A. S.; et al. Specific dynamic action in ectothermic vertebrates: a review of the determinants of postprandial metabolic response in fishes, amphibians, and reptiles. **Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates**, p. 305–324, 2005. Disponível em: <<http://www.rc.unesp.br/ib/zoologia/denis/reprints%20-%20pdf/Review%20SDA.pdf>>. Acesso em ago. 2015.

ANELLI, L. C.; OLLE, C. D.; COSTA, et al. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from the neotropical teleost *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887 - *Teleostei, Serrasalminidae*). **Journal of Thermal Biology**, v. 29, n. 2, p. 103–113, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article000998>>. Acesso em: set. 2016.

ARANTES, Í. D. C.; VASCONCELLOS, M. M.; BOAS, T. C. V.; et al. Sexual dimorphism, growth, and longevity of two toad species (*Anura, Bufonidae*) in a neotropical Savanna. **Copeia**, v. 103, n. 2, p. 329–342, 2015. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/10.1614-092>>. Acesso em: set. 2016.

ARESE, P.; BOSIA, A.; ROSSINI, L. Short-term effects of calcium , potassium , and of ouabain on metabolite levels in the frog heart *in vivo*. **European Journal of Biochemistry**, v. 11, p. 80–88, 1969. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00742.x/full>>. Acesso em: out. 2016.

AUBRET, F.; TORT, M.; BLANVILLAIN, G. A Non-invasive method of measuring heart rates in small reptiles and amphibians. **Herpetological Review**, v. 44, p. 421–423, 2013. Disponível em: <[http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/45898109/A\\_non-invasive\\_method\\_of\\_measuring\\_heart20160523-14261](http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/45898109/A_non-invasive_method_of_measuring_heart20160523-14261)>. Acesso em mar. 2017.

AVANCINI A; FAVARETTO, C. **Biologia – Uma abordagem evolutiva e ecológica**. 3 ed. São Paulo: Editora Moderna, 1997.

BAKER, J. B. E. The influence of calcium and potassium ions on the toxicity of ouabain. v. 2,

p. 259–267, 1947. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.1947.tb00343.x/full>>. Acesso em dez. 2016.

BAKER, P. F.; BLAUSTEIN, M. P.; HODGKIN, A. L.; STEINHARDT, R. A. The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. **Journal of Physiology**, v. 200, p. 431–458, 1969. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.1969.sp008702/full>>. Acesso em: dez. 2016.

BARR, L.; DEWEY, M. M.; BERGER, W. Propagation of action potentials and the structure of the nexus in cardiac muscle. **The Journal of General Physiology**, v. 48, n. 5, p. 797–823, 1965. Disponível em: <<http://jgp.rupress.org/content/48/5/797.abstract>>. Acesso em jan. 2015

BASSANI, B. Y. R. A.; BASSANI, J. W. M.; BERS, D. M. Mitochondrial and sarcolemal  $\text{Ca}^{2+}$  transport reduce during acfeine contractures in rabbit cardiac myocytes. **Journal of Physiology**, v. 453, p. 591–608, 1992. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.1992.sp019246/full>>. Acesso em: dez 2016.

BASSANI, J. W.; BASSANI, R. A.; BERS, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **The Journal of physiology**, v. 476, n. 2, p. 279–93, 1994. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1160440&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: jan. 2017.

BEEBEE, T. J. C.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? **Biological Conservation**, v. 125, n. 3, p. 271–285, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/art/S0006320705001825>>. Acesso em jan. 2017.

BENNETT, A. F.; LICHT, P. Anaerobic metabolism during activity in amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 48, n. 2, p. 319–327, 1974. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300962974907129>>. Acesso em jan. 2017.

BERS, D. M. **Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force**. 2 ed.

Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 237 p., 2001.

BERS, D. M.; CHRISTENSES, D. M.; NGUYEN, T. X. Can Ca entry via Na-Ca exchange directly activate cardiac muscle contraction ? **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 20, p. 405–414, 1988. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022282888801329>>. Acesso em set. 2016.

BETTEX, D. A.; PRÊTRE, R.; CHASSOT, P. G. Is our heart a well-designed pump? the heart along animal evolution. **European Heart Journal**, 2014. . Disponível em: <<https://academic.oup.com/eurheartj/article/35/34/2322/2481347/Is-our-heart-a-well-designed-pump-The-heart-along>>. Acesso em fev. 2017.

BLAUSTEIN, A. R.; HAN, B. A.; RELYEA, R. A.; et al. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, p. 108–119, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749010.05909.x/full>>. Acesso em mar. 2016.

BLAUSTEIN, M. P.; LEDERER, W. J. Sodium calcium exchange: Its physiological implications. **Physiological reviews**, v. 79, n. 3, p. 763–854, 1999. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/content/79/3/763.short>>. Acesso em fev. 2016.

BOCALINI, D. S.; DOS-SANTOS, L.; ANTONIO, E. L.; et al. Myocardial remodeling after large infarcts in rat converts post rest-potential in force decay. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n. 3, p. 243–251, 2012. Disponível em:< [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0066-782X2012000300007&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0066-782X2012000300007&script=sci_arttext&tlng=es)>. Acesso em dez. 2016.

BONTING, S. L.; CARAVAGGIO, L. L.; HAWKINS, N. M. Studies on sodium-potassium-activated adenosinetriphosphate. iv. correlation with cation transport sensitive to cardiac glycosides. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 98, p. 413–419, 1962. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/00039861629>>. Acesso em: jan. 2017.

BOSSSEN, E. H.; SOMMER, R. Comparative stereology of the lizard and frog myocardium. v.

16, n. 2, p. 173–178, 1984. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040816684900429>>. Acesso em dez. 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>>. Acesso em abr. 2016.

BRANDT, P. W.; COLOMO, F.; PIRODDI, N.; POGGESI, C.; TESI, C. Force regulation by  $\text{Ca}^{2+}$  in skinned single cardiac myocytes of frog. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 1994–2004, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1299540&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em abr. 2015.

BUCHER, T. L.; RYAN, M. J.; BARTHOLOMEW, G. A. Oxygen consumption during resting, calling, and nest building in the frog *Physalaemus pustulosus*. **Physiological Zoology**, v. 55, n. 1, p. 10–22, 1982. Disponível em: <<http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/physzool.55.1.30158439>>. Acesso em mar. 2015.

BURGGREN, W.; FARRELL, A.; LILLYWHITE, H. Vertebrate cardiovascular systems. **Comprehensive Physiology**, v. 30, p. 215–308, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.cp130104>>. Acesso em ago. 2016.

BURGGREN, W.; MOALLF, R. “Active” regulation of cutaneous exchange by capillary recruitment in amphibians: Experimental evidence and a revised model for skin respiration.

**Respiration Physiology**, v. 55, n. 3, p. 379–392, 1984. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0034568784900598>>. Acesso em set. 2015.

BURGGREN, W. W.; FEDER, M. E.; PINDER, A. W. Temperature and the balance between aerial and aquatic respiration in larvae of *Rana berlandieri* and *Rana catesbeiana*.

**Physiological Zoology**, v. 56, n. 2, p. 263–273, 1983. Disponível em: <<http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/physzool.56.2.30156058>>. Acesso em dez.

2014.

CABANAC, A.; CABANAC, M. Heart rate response to gentle handling of frog and lizard.

**Behavioural Processes**, v. 52, n. 2–3, p. 89–95, 2000. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037663570000108X>>. Acesso em jan.2015.

CAREY, C.; ALEXANDER, M. A. Climate change and amphibian declines: Is there a link?

**Diversity and Distributions**, 2003.

CARMELIET, E. E. Influence of lithium ions on the transmembrane potential and cation content of cardiac cells. **The Journal of general physiology**, v. 47, p. 501–530, 1964.

Disponível em: <[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=219](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2195385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)

[5385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2195385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)>.

CERON, K.; LUCAS, E. M. Anurans of parque estadual da serra furada , Santa Catarina , southern Brazil. **Herpetology Notes**, v. 10, p. 287–296, 2017.

CERRA, M. C.; IMBROGNO, S. Phospholamban and cardiac function: A comparative perspective in vertebrates. **Acta Physiologica**, v. 205, n. 1, p. 9–25, 2012.

CHAPOVETSKY, V.; KATZ, U. Effects of season and temperature acclimation on electrocardiogram and heart rate of toads. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 134, p. 77–83, 2003.

CIFUENTES, F.; VERGARA, J.; HIDALGO, C. Sodium / calcium exchange in amphibian skeletal muscle fibers and isolated transverse tubules Sodium / calcium exchange in amphibian skeletal muscle fibers and isolated transverse tubules. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 279, p. 89–97, 2000.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. **Laboratory animals**, v. 31, p. 1–32, 1997.

COLLINS, J. P. Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to

learn. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 92, p. 93–99, 2010.

COLOMO, F.; PIRODDI, N.; POGGESI, C.; et al. Active and passive forces of isolated myofibrils from cardiac and fast skeletal muscle of the frog. **The Journal of physiology**, v. 500, n. 2, p. 535–548, 1997.

CORONADO, R.; MORRISSETTE, J.; SUKHAREVA, M.; et al. Structure and function of ryanodine receptors. **Am.J.Physiol**, v. 6, p. C1485–C1504, 1994.

COSTA, M. J.; MONTEIRO, D. A.; OLIVEIRA-NETO, A. L.; et al. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original **Ecotoxicology**, v. 17, p. 153–163, 2008.

COSTA, M. J.; OLLE, C. D.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Role of the sarcoplasmic reticulum in calcium dynamics of the ventricular myocardium of *Lepidosiren paradoxa* (*Dipnoi*) at different temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 29, n. 2, p. 81–89, 2004.

COSTA, M. J.; RIBEIRO, L. R.; SALLA, R. F.; GAMERO, F. U.; ALVES, L. M. L. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Effects of the organophosphorus pesticide Folisuper 600 (methyl parathion) on the heart function of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, 2015.

DAL-MEDICO, S. E.; RISSOLI, R. Z.; GAMERO, et al. Negative impact of a cadmium concentration considered environmentally safe in Brazil on the cardiac performance of bullfrog tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 168–174, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.003>>.

SILVANO, D.; SCOTT, N.; AQUINO, L.; KWET, A.; BALDO, D. 2010. *Rhinella icterica*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T54668A11184033. Acesso em: 03/092017.

DODE, L.; VAN BAELEN, K.; WUYTACK, F.; et al. Low temperature molecular adaptation of the skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 1 (serca 1) in the wood frog



(*Rana sylvatica*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 3911–3919, 2001.

DOS SANTOS, V. G. T.; AMATO, S. B.; BORGES-MARTINS, M. Community structure of helminth parasites of the Cururu toad, *Rhinella icterica* (Anura: *Bufo*) from southern Brazil. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1097–1103, 2013.

DRIEDZIC, B. Y. W. R.; GESSER, H.; DRIEDZIC, W. R. Differences in force-frequency relationships and calcium dependency between elasmobranch and teleost hearts. **Journal of Experimental Biology**, v. 140, p. 227–241, 1988.

DRIEDZIC, W. R.; GESSER, H.  $Ca^{2+}$  protection from the negative inotropic effect of contraction frequency on teleost hearts. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 156, n. 1, p. 135–142, 1985.

DRIEDZIC, W. R.; GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. **Physiological reviews**, v. 74, n. 1, p. 221–58, 1994a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8295934>>.

DRIEDZIC, W. R.; GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. **Physiological reviews**, v. 74, n. 1, p. 221–58, jan. 1994b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8295934>>.

EINTHOVEN, W. Ueber die Form des menschlichen Electrocardiogramms. **Pflügers Archiv f. Physiologie**, v. 60, n. 3–4, p. 101–123, 1885.

FABIATO, A.; FABIATO, F. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 307, p. 491–522, 1978.

FALCKE, M.; LI, Y.; LECHLEITER, J. D.; CAMACHO, P. Modeling the dependence of the period of intracellular  $Ca^{2+}$  waves on SERCA expression. **Biophysical journal**, v. 85, n. 3, p. 1474–1481, 2003. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi>

?dbfrom=pubmed&id=1ks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1016/S0006-3495(03)74580-9>.

FARRELL, A. P.; JONES, D. The Heart. **Fish Physiology**, v. XII, p. 1–88, 1992.

FARRELL, A. P. Cardiac scope in lower vertebrates. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, n. 7, p. 1981–1984, 1991.

FARRELL, A.; GAMPERL, A.; HICKS, J.; et al. Maximum cardiac performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at temperatures approaching their upper lethal limit. **The Journal of experimental biology**, v. 199, n. Pt 3, p. 663–72, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9318401>>.

FARRELL, a P.; COLUMBIA, B. Circulation in Vertebrates. **Encyclopedia of life Sciences**, p. 1–15, 2001.

FEDER, M. E. Responses to acute aquatic hypoxia in larvae of the frog *Rana berlandieri*. **J. Exp. Biol.**, v. 104, n. 1, p. 79–95, 1983. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/content/104/1/79.short>>.

FELLERS, G. M. Aggression, territoriality, and mating behaviour in North American treefrogs. **Animal Behaviour**, v. 27, n. PART 1, p. 107–119, 1979.

FISCH, C. Centennial of the string galvanometer and the electrocardiogram. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 36, n. 6, p. 1737–1745, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(00\)00976-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(00)00976-1)>.

FODEN, W. B.; BUTCHART, S. H. M.; STUART, et al. Identifying the world's most climate change vulnerable species: a systematic trait-based assessment of all birds, amphibians and corals. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e65427, 2013.

FORBES, M. S.; SPERELAKIS, N. Ultrastructure of lizard ventricular muscle. **J. Ultrastructure Research**, v. 34, p. 439–451, 1971.

FORTI, L. R. Temporada reprodutiva, micro-habitat e turno de vocalização de anfíbios anuros em lagoa de Floresta Atlântica, no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecias**, v.

11, n. 1, p. 89–98, 2009.

FRANCAZ, J. M.; AUPY, M. Action de la température sur la forme de électrocardiogramme chez quelques amphibiens et reptiles. **Séanc. Soc. Biol.**, v. 163, p. 48–51, 1969.

FRITSCH, R. Ontogeny of cardiovascular control in amphibians. **American Zoologist**, v. 37, n. 1. English Article, zoo, pet, p. 23–30, 1997.

FUJINO, S. Positive Inotropic Action Evoked by Intracellular Effects of Ouabain in Heart Ventricle of Frog. **Proc. Japan Acad.**, v. 50, p. 226–230, 1974.

FUJINO, S.; FUJINO, M. Ouabain potentiation and Ca release from sarcoplasmic reticulum in cardiac and skeletal muscle cells. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. 4, p. 542–555, 1982.

Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6286075](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6286075)>.

FURMAN, K. I. The electrocardiogram of the South African clawed toad (*Xenopus laevis*) with special reference to temperature effects. **South African Journal of Medical Sciences**, v. 25, p. 109–118, 1960.

GANS, C. Sound production in the salientia: mechanism and evolution of the emitter. **American Zoologist**, v. 13, p. 1179–1194, 1973.

GEERING, K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. **Am.J Physiol Renal Physiol**, v. 290, n. 2, p. F241–F250, 2006.

GERMER, C. M.; TOMAZ, J. M.; CARVALHO, et al. M. Electrocardiogram, heart movement and heart rate in the awake gecko (*Hemidactylus mabouia*). **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 185, n. 1, p. 111–118, 2015.

GLITSCH, B. Y. H. G.; REUTER, H.; SCHOLZ, H. The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. **Journal of Physiology**, v. 209, p. 25–43, 1970.

GOTO, M.; KIMOTO, Y.; SAITO, M.; WADA, Y. Tension fall after contraction of bullfrog atrial muscle examined with the voltage clamp technique. **The Japanese journal of physiology**, v. 22, n. 6, p. 637–650, 1972.

GUÉNETTE, S. A.; GIROUX, M.-C.; VACHON, P. Pain perception and anaesthesia in research frogs. **Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 62, n. 2, p. 87–92, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/615302>>.

GWATHMEY, J. K.; MORGAN, J. P. Calcium handling in myocardium from amphibian, avian, and mammalian species: the search for two components. **J.Comp Physiol B**, v. 161, n. 1, p. 19–25, 1991.

HARRI, M. N. E.; TALO, A. Effect of season and temperature acclimation on the heart rate-temperature relationship in the frog, *Rana temporaria*. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 50, n. 3, p. 469–472, 1975.

HARTZELL, H. C. Phosphorylation of C-protein in intact amphibian cardiac muscle. Correlation between <sup>32</sup>P incorporation and twitch relaxation. **J Gen Physiol**, v. 83, p. 563–588, 1984.

HILLMAN, S. S.; WITHERS, P. C.; PALIOCA, W. B.; RUBEN, J. A. Cardiovascular consequences of hypercalcemia during activity in two species of amphibian. **J Exp Zool**, v. 242, p. 303–308, 1987.

HOLMES, E. B. **Manual of Comparative Anatomy: A Laboratory Guide and Brief Text**. New York: Macmillan, 1975.

HOPKINS, W. A. Amphibians as Models for Studying Environmental Change. **ILAR Journal**, v. 48, n. 3, p. 270–277, 2007. Disponível em: <<http://ilarjournal.oxfordjournals.org/content/48/3/270.abstract>>.

HORISBERGER, J. D. Recent Insights into the Structure and The Sodium Pump. **Physiology**, v. 19, p. 377–387, 2004.

HOVE-MADSEN, L. The influence of temperature on ryanodine sensitivity and the force-frequency relationship in the myocardium of rainbow trout. **The Journal of experimental biology**, v. 167, p. 47–60, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/1634866>>.

HOVE-MADSEN, L.; GESSER, H. Force frequency relation in the myocardium of rainbow trout - Effects of K<sup>+</sup> and adrenaline. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 159, n. 1, p. 61–69, 1989.

HUANG, C. Y. Electron Microscopic Study of the Development of Heart Muscle of the Frog *Rana pipiens*. **J. Ultrastructure Research**, v. 20, p. 211–226, 1967.

IRSCHICK, D. J.; GARLAND, T. Integrating function and ecology in studies of adaptation: Investigations of locomotor capacity as a model system. v. 32, n. 2001, p. 367–396, 2001.

IWATA, T.; KRAEV, A.; GUERINI, D.; CARAFOLI, E. A new splicing variant in the frog heart sarcolemmal Na-Ca exchanger creates a putative ATP-binding site. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 37–45, 1996.

JAMES, T. Y.; TOLEDO, L. F.; RÖDDER, D.; et al. Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: Lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 18, p. 4079–4097, 2015.

JOHANSEN, K. Cardiovascular Dynamics in Fishes, Amphibians, and Reptiles. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 127, n. 1, p. 414–442, 1965.

JOHANSEN, K.; BURGGREN, W. W. **Cardiovascular function in the lower vertebrates**. 1 edition ed. New York: Academic Press, 1980.

JONES, L. R. Ryanodine-induced stimulation of net Ca<sup>2+</sup> uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 109, n. 1, p. 48–55, 1979.

JØRGENSEN, C. B. Amphibian respiration and olfaction and their relationships: from Robert

Townson (1794) to the present. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 75, n. 3, p. 297–345, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub/11034014>>.

JU, Y.-K.; ALLEN, D. G. The mechanisms of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in toad pacemaker cells. **The Journal of Physiology**, v. 525, n. 3, p. 695–705, 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00695.x>>.

JU, Y. K.; ALLEN, D. G. Intracellular calcium and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange current in isolated toad pacemaker cells. **J. Physiol.**, v. 508, n. 1998, p. 153–66, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/artid=2230862&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

JU, Y. K.; ALLEN, D. G. How does β-adrenergic stimulation increase the heart rate? The role of intracellular Ca<sup>2+</sup> release in amphibian pacemaker cells. **Journal of Physiology**, v. 516, n. 3, p. 793–804, 1999.

KAVALER, F. 1. Introduction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 6, p. 575–580, 1974. Disponível em: <<http://utpjournals.metapress.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.3138/ptc.2009-09-s1>>.

KAWATA, H. Contractility of the frog ventricular myocardium in sodium-free lithium solution. **The Japanese journal of physiology**, v. 29, n. 5, p. 609–25, 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/316476>>.

KEEN, J. E.; FARREL, A. P. Effect of ryanodine, calcium, and adrenaline on force-frequency relationship in atrial strips from skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, p. 1211–1217, 1992.

KHAN, M. G. **Rapid ECG interpretation**. Third Edit ed. New Jersey: Humana Press, 2008.

KIBLER, N. A.; NUZHNY, V. P.; ACHMETZHYNNOVA, et al. Effects of heart rate on the pump function and electrophysiological characteristics of the heart in the frog *Rana temporaria*. **International Journal of Biomedicine**, v. 7, n. 1, p. 46–50, 2017.

KLAUTZ, R. J. M.; BAAN, J.; TEITEL, D. F. The effect of sarcoplasmic reticulum blockade

on the force/frequency relationship and systolic contraction patterns in the newborn pig heart.

**Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 435, n. 1, p. 130–136, 1997.

KOCH-WESER, J.; BLINKS, J. R. the Influence of the Interval Between Beats on Myocardial Contractility. **Pharmacol. Rev.**, v. 15, n. 3, p. 601–652, 1963. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/15/3/601.abstract>>.

KOMURO, I.; WENNINGER, K. E.; PHILIPSON, K. D.; IZUMO, S. Molecular cloning and characterization of the human cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 4769–4773, 1992.

Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=49165&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KWET, A.; DI-BERNARDO, M.; MANEYRO, R. First record of *Chaunus achavali* (Anura, *Bufo*nidae) from Rio Grande do Sul, Brazil, with a key for the identification of the species in the *Chaunus marinus* group. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 96, n. 4, p. 479–485, 2006.

LARDNER, B.; LOMAN, J. Growth or reproduction? Resource allocation by female frogs *Rana temporaria*. **Oecologia**, v. 137, n. 4, p. 541–546, 2003.

LAYLAND, J.; KENTISH, J. C. Positive force and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 276, p. H9–H18, 1999.

LEE, S.-L.; YU, A. S. L.; LYTTON, J. Tissue-specific Expression of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger isoforms. **the Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 21, p. 14849–14852, 1994.

LILLYWHITE, H. B.; ZIPPEL, K. C.; FARRELL, A. P. Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 124, n. 4, p. 369–382, 1999.

LIMA, M. S.; PEDERASSI, J.; SOUZA, C. A. dos S.; SILVA, C. de P. A.; PEIXOTO, O. L. Distribuição e fidelidade de desenvolvimento de *Rhinella icterica* (Anura, *Bufo*nidae) no rio

Cachimbaú, Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 12, n. 2, p. 151–156, 2010.

LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER, T.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. **the Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 31, p. 19659–19662, 1994.

LIU, C.-B.; LI, R. Electrocardiogram and heart rate in response to temperature acclimation in three representative vertebrates. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 142, n. 4, p. 416–421, 2005.

LIU, J.; TIAN, J.; HAAS, M.; SHAPIRO, J. I.; ASKARI, A.; XIE, Z. Ouabain interaction with cardiac  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 36, p. 27838–27844, 2000.

LONGHINI, L. S.; ZENA, L. A.; DA SILVA, G. S. F.; BÍCEGO, K. C.; GARGAGLIONI, L. H. Temperature effects on the cardiorespiratory control of American bullfrog tadpoles based on a non-invasive methodology. **The Journal of Experimental Biology**, n. in press, 2017. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jeb.160911>>.

LUTTGAU, B. Y. H. C.; NIEDERGERKE, R. On the frog s heart. **Journal of Physiology**, v. 143, p. 486–505, 1958.

MACHIN, K. L. Amphibian Pain and Analgesia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n. 1, p. 2–10, 1999.

MACLENNAN, D. H.; BRANDL, C. J.; KORCZAK, B.; et al. Amino-acid sequence of a  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. **Nature**, v. 316, p. 696–700, 1985. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/316696a0>>.

MARÍN, J.; REDONDO, J. Vascular sodium pumpendothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 84, n. 3, p.



249–271, 1999.

MARSHALL, C. R.; FOX, J. a; BUTLAND, S. L.; et al. Phylogeny of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) genes from genomic data identifies new gene duplications and a new family member in fish species. **Physiological genomics**, v. 21, p. 161–173, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741504>>.

MARTIN, W. F.; GANS, C. Muscular control of the vocal tract during release signaling in the toad *Bufo valliceps*. **Journal of Morphology**, v. 137, n. 1, p. 1–27, 1972. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jmor.1051370102>>.

MAZZA, R.; GATTUSO, A.; MANNARINO, C.; et al. Catestatin (chromogranin A344-364) is a novel cardiosuppressive agent: inhibition of isoproterenol and endothelin signaling in the frog heart. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 295, n. 1, p. H113-122, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2494752&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MCCALL, B. Y. E.; ORCHARD, C. H. The effect of acidosis on the interval-force relation and mechanical restitution in ferret papillary muscle. **Journal of Physiology**, v. 432, p. 45–63, 1991.

MCWILLIAMS, D. A. Nutrition recommendations for some captive amphibian species ( anura and caudata ). **Msc. Dissertation**, p. 34, 2008.

MIKAMI, A.; IMOTO, K.; TANABE, T.; et al. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. **Nature**, v. 340, p. 230–233, 1989. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v340/n6230/abs/340230a0.html>>.

MILL, J. G.; NOVAES, M. A.; GALON, M.; et al. Comparison of the contractile performance of the hypertrophied myocardium from spontaneous hypertensive rats and normotensive infarcted rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 76, p. 387–394, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Pub Med&>

dopt=Citation&list\_uids=9795747>.

MÖLLER-NIELSEN, T.; GESSER, H. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling at 20 and 10 in rainbow trout myocardium. v. 162, p. 526–534, 1992.

MONTEIRO, D. A.; KALININ, A. L.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; 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.

MORAD, B. Y. M.; ORKAND, R. K. et al. Rapid photochemical inactivation of Ca<sup>2+</sup> antagonists shows that Ca<sup>2+</sup> entry directly activates contraction in frog heart. **Nature**, v. 304, n. 18, p. 635–638, 1983.

MORETTI, E. H.; MADELAIRE, C. B.; SILVA, R. J.; et al. The relationships between parasite intensity, locomotor performance, and body condition in adult toads (*Rhinella icterica*) from the Wild. **Journal of Herpetology**, v. 48, n. 3, p. 277–283, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1670/10-339>><http://journalofherpetology.org/doi/pdf/10.1670/10-339>>.

MULLEN, R. K. Electrocardiographic evidence of a contractile bulbus cordis in squamate reptiles. **Copeia**, p. 802–805, 1973.

MULLEN, R. K. Electrocardiographic characteristics of four anuran amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 49, n. 4, p. 647–654, 1974.

MUÑOZ-CHÁPULI, R.; HAMLETT, W. C. Epilogue: comparative cardiovascular biology of lower vertebrates. **The Journal of experimental zoology**, v. 275, n. 2–3, p. 249–51, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8676098>>.

MURPHY, R. M.; LARKINS, N. T.; MOLLICA, J. P.; et al. Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca<sup>2+</sup> storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat. **The Journal of physiology**, v. 587, p. 443–60, 2009.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029185>>

NAKAI, J.; OGURA, T.; PROTASI, et al. Functional nonequality of the cardiac and skeletal ryanodine receptors. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 94, p. 1019–1022, 1997.

NAYLERT, W. G. An effect of ouabain of calcium on the superficially-located in cardiac muscle cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 5, p. 101–110, 1973.

NIEDERGERKE, R. Movements of Ca in beating ventricles of the frog heart. **J. Physiol.**, v. 167, p. 551–580, 1963.

NIEDERGERKE, R.; PAGE, S. An analysis of caffeine action in single trabeculae of the frog heart. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 213, p. 303–324, 1981.

O'ROURKE, D. P. Amphibians used in research and teaching. **ILAR journal**, v. 48, n. 3, p. 183–187, 2007.

OCAMPO, M. C.; ORREGO, F. Differential effects of ouabain and 2, 4-dinitrophenol on contractile tension of and on sodium and calcium efflux from frog heart ventricular strips. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 74, p. 341–351, 1981.

PAGE, S. G.; NIEDERGERKE, R. Structures of physiological interest in the frog heart ventricle. **Journal of cell science**, v. 11, p. 179–203, 1972.

PASANEN, S.; KOSKELA, P. Seasonal and age variation in the metabolism of the common frog, *Rana temporaria* L. In Northern Finland. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology**, v. 47, n. 2, p. 635–654, 1974.

PEACHEY, L. D. the Sarcoplasmic and Transverse Frog Sartorius Reticulum. **The Journal of Cell Biology**, v. 25, n. 3, p. 209–231, 1965.

PELSTER, B.; BURGGREN, W. W.; PETROU, S.; et al. Developmental changes in the acetylcholine influence on heart muscle of *Rana catesbeiana*: *in situ* and *in vitro* effects. **J Exp Zool.**, v. 267, n. 1, p. 1–8, 1993.

PERIASAMY, M.; KALYANASUNDARAM, A. SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. **Muscle and Nerve**, v. 35, p. 430–442, 2007.

PERRY, G.; LEVERING, K.; GIRARD, I.; et al. Locomotor performance and social dominance in male *Anolis cristatellus*. **Animal Behaviour**, v. 67, n. 1, p. 37–47, 2004.

PETROFF, M. G. V.; PALOMEQUE, J.; MATTIAZZI, A. R. Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchange Function Underlying Contraction Frequency Inotropy in the Cat Myocardium. **The Journal of Physiology**, v. 550, n. 3, p. 801–817, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.c2003.044321>>.

PIMENTA, B. V. S.; HADDAD, C. F. B.; NASCIMENTO, L. B.; et al. Echnical omment. **Science**, v. 309, p. 1999–2001, 2005.

PINHÃO, R; WUNDERLICH, A.C.; ANJOS, L.A.; et al. Helminths of toad *Rhinella icterica* (Bufonidade), from the municipality of Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Neotropical helminthology**, v. 3, n. 1, p. 35–40, 2009.

POUGH, F. H.; TAIGEN, T. L. Metabolic correlates of the foraging and social behaviour of dart-poison frogs. **Animal Behaviour**, v. 39, n. 1, p. 145–155, 1990.

PRA, P. D.; ROSSINI, L.; SEGRE, G. The kinetics of ouabain uptake in frog heart in relation to the kinetics of inotropic effect and to the activation of transport ATP-ases. **Pharmacological Research Communications**, v. 2, n. 3, p. 177–189, 1970.

RIVAROLI, L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish: Curimbata, *Prochilodus lineatus* (Teleostei, *Prochilodontidae*), and trahira, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, *Erythrinidae*). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 145, n. 3, p. 322–327, 2006.

ROCHA, M. L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Importance of the sarcoplasmic reticulum and adrenergic stimulation on the cardiac contractility of the neotropical teleost *Synbranchus marmoratus* under different thermal conditions. **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 177, n. 7, p. 713–21, out. 2007.

ROCHA, P. L.; BRANCO, L. G. Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and

metabolic responses to temperature and hypoxia in the bullfrog *Rana catesbeiana*. **The Journal of experimental biology**, v. 201, n. Pt 5, p. 761–8, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9542154>>.

ROMANIN, C.; KARLSSOM, J.-O.; SCHINDLER, H. Activity of cardiac L-type Ca channels is sensitive to cytoplasmic calcium. **European Journal of Physiology**, v. 421, p. 516–518, 1992.

ROULET, M.; MONGO, K. G.; VASSORT, G.; et al. The dependence of twitch relaxation on sodium ions and on internal Ca stores in voltage clamped frog atrial fibres. **Pflugers Archiv**, v. 379, p. 259–268, 1979.

SABAGH, L. T.; CARVALHO-E-SILVA, A. M. P. T. Feeding overlap in two sympatric species of *Rhinella* (Anura: Bufonidae) of the Atlantic Rain Forest. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 2, p. 247–253, 2008.

SABAGH, L. T.; CARVALHO-E-SILVA, A. M. P. T.; ROCHA, C. F. D. Diet of the toad *Rhinella icterica* (Anura : Bufonidae) from Atlantic Forest Highlands of southeastern Brazil  
Diet of the toad *Rhinella icterica* (Anura : Bufonidae) from atlantic forest highlands of southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 12, n. 4, p. 0–5, 2012.

SALLA, R. F.; GAMERO, F. U.; RIBEIRO, L. R.; et al. Cardiac adaptations of bullfrog tadpoles in response to chytrid infection. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 323, n. 7, p. 487–496, 2015.

SALLA, R. F.; GAMERO, F. U.; RISSOLI, R. Z.; et al. Impact of an environmental relevant concentration of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v. 144, 2016.

SCHOCH, R. R. Amphibian Evolution. **Amphibian Evolution: The Life of Early Land Vertebrates**, p. 1–264, 2014. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84899968199%7B&%7DpartnerID=tZOtx3y1>>.

SEYMOUR, R. S. Physiological Correlates of Forced Activity and Burrowing in the Spadefoot Toad, *Scaphiopus hammondi*. **Copeia**, v. 1973, n. 1, p. 103–115, 1973. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1442364?origin=crossref>>.

SHEMAROVA, I. V.; KUZNETSOV, S. V.; DEMINA, et al. T-channels and Na<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup>-exchangers as components of the Ca<sup>2+</sup>-system of regulation of activity of the heart myocardium of the frog *Rana temporaria*. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 45, n. 3, p. 389–399, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S0022093009030089>>.

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

SHIELS, H. A.; GALLI, G. L. The sarcoplasmic reticulum and the evolution of the vertebrate heart. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, n. 6, 2014.

SHIELS, H. A.; VORNANEN, M.; FARRELL, A. P. The force-frequency relationship in fish hearts - A review. In: *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 4, **Anais...**2002.

SHIELS, H. a; FARRELL, a P. The effect of ryanodine on isometric tension development in isolated ventricular trabeculae from *Pacific mackerel (Scomber japonicus)*. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 125, n. 3, p. 331–41, mar. 2000.

SHUBA, Y. M.; IWATA, T.; NAIDENOV, V. G.; et al. A novel molecular determinant for cAMP-dependent regulation of the frog heart Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 30, p. 18819–18825, 1998.

SIMMERMAN, H. K.; JONES, L. R. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. **Physiol Rev.**, v. 78, n. 4, p. 921–947, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790566>>.

- SKOU, J. C.; ESMANN, M. The Na, K-ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 24, n. 3, p. 249–261, 1992.
- SMITH, G. L.; ALLEN, D. G. Effects of metabolic blockade on intracellular calcium concentration in isolated ferret ventricular muscle. **Circulation research**, v. 62, n. 6, p. 1223–1236, 1988.
- ŠOLC, D. The heart and heart conducting system in the kingdom of animals: A comparative approach to its evolution. **Experimental and Clinical Cardiology**, v. 12, n. 3, p. 113–118, 2007.
- SOLÉ, M.; ROCHA, M. S.; DECARLI, C.; et al. Diet of post-metamorphic *Rhinella icterica* ( Spix , 1824 ) from the Araucaria Plateau of Rio Grande do Sul , Brazil ( Anura : Bufonidae ). **Herpetology Notes**, v. 10, p. 443–448, 2017.
- SOMMER, J. R.; JOHNSON, E. A. Comparative ultrastructure of cardiac cell membrane specializations. A review. **The American Journal of Cardiology**, 1970.
- SOWMIYA, S.; JAYANTHI, T. Hybrid low power touch ecg using dry metal sensor and hrv analysis using MATLAB. **International Journal of Recent Development in Engineering and Technology**, v. 2, n. 2, p. 66–70, 2014.
- ST-PIERRE, J.; BRAND, M. D.; BOUTILIER, R. G. The effect of metabolic depression on proton leak rate in mitochondria from hibernating frogs. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 9, p. 1469–1476, 2000.
- STALEY, N. A.; BENSON, E. S. the Ultrastructure of Frog Ventricular Cardiac Muscle and Its Excitation-Contraction Coupling. n. 8, 1968.
- STEVENS, C. W. Analgesia in amphibians: Preclinical studies and clinical applications. **Vert Clin Exot Anim**, v. 14, n. 1, p. 33–44, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2010.09.007>>.
- SUBRAMANI, S.; BALAKRISHNAN, S.; JYOTI, T.; et al. Force-frequency relation in frog-

ventricle is dependent on the direction of sodium/calcium exchange in diastole. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 185, n. 3, p. 193–202, 2005.

SUBRAMANI, S.; VIJAYANAND, C.; THARION, E. Differential effects of organic calcium-channel blockers on diastolic SR calcium-handling in the frog heart. **British journal of pharmacology**, v. 137, n. 6, p. 756–760, 2002. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1573549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

TAIGEN, T. L.; WELLS, MARSH, R. I. Division of comparative physiology and biochemistry , society for integrative and comparative biology. **Physiological Zoology**, v. 58, n. 6, p. 719–726, 1985.

TAIGEN, T. L.; POUGH, F. H. Prey preference, foraging behavior and metabolic characteristics of frogs. **The American Naturalist**, v. 122, n. 4, p. 509–520, 1983.

TAIGEN, T. L.; POUGH, F. H. Metabolic correlates of anuran behavior. **Integrative and Comparative Biology**, v. 25, n. 4, p. 987–997, 1985.

TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 3, p. 855–916, 1999.

TAYLOR, E. W.; LEITE, C. A. C.; SARTORI, M. R.; et al. The phylogeny and ontogeny of autonomic control of the heart and cardiorespiratory interactions in vertebrates. **The Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 5, 2014.

TAYLOR, E. W.; SKOVGAARD, N.; LEITE, C. A. C.; et al. Autonomic control of heart rate is virtually independent of temperature but seems related to the neuroanatomy of the efferent vagal supply to the heart in the bullfrog, *Lithobates catesbeianus*. **Journal of Thermal Biology**, v. 37, n. 3, p. 243–247, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.01.007>>.

THOMAS JR., L. J. ouabain contracture of frog heart: Ca<sup>45</sup> movements and effect of



EDTA. **Am J Physiol**, v. 199, p. 146–150, 1960. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=13838004](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13838004)>.

TIBBITS, G. F. Towards a molecular explanation of the high performance of the tuna heart. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 113, n. 1, p. 77–82, 1996.

TIBBITS, G. F.; HOVEMADSEN, L.; BERS, D. M. Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts - a comparison with higher vertebrates. **Canadian Journal of Zoology - Journal Canadien de Zoologie**, v. 69, p. 2014–2019, 1991.

TIBBITS, G. F.; XU, L.; SEDARAT, F. Ontogeny of excitation-contraction coupling in the mammalian heart. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 132, n. 4, p. 691–8, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095856>>.

TIJSKENS, P.; MEISSNER, G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. Location of ryanodine and dihydropyridine receptors in frog myocardium. **Biophysical journal**, v. 84, n. 2 Pt 1, p. 1079–92, 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1302685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

TOFT, C. A. Feeding ecology of thirteen syntopic species of anurans in a seasonal tropical environment. **Oecologia**, v. 45, n. 1, p. 131–141, 1980.

TOFT, C. A. Feeding ecology of panamanian litter anurans : patterns in diet and foraging mode feeding ecology of panamanian litter anurans : patterns in diet and foraging mode. v. 15, n. 2, p. 139–144, 1981.

TOLEDO, L. F.; BATISTA, R. F. Integrative study of brazilian anurans: geographic distribution, size, environment, taxonomy, and conservation. **Biotropica**, v. 44, n. 6, p. 785–792, 2012.

TULLIS, A.; BLOCK, B. A. Expression of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>(2+)</sup>-ATPase isoforms in marlin and swordfish muscle and heater cells. **American Journal of Physiology -**

**Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 271, p. R262–R275, 1996.

Disponível em: <<http://ajpregu.physiology.org/ajpregu/271/1/R262.full.pdf>>.

TUNSTALL, J.; CHAPMANT, R. A. The effect of ryanodine on the contraction of isolated frog atrial trabeculae is. p. 435–444, 1994.

ULTSCH, G. R.; REESE, S. A.; STEWART, E. R. Physiology of hibernation in *Rana pipiens*: metabolic rate, critical oxygen tension, and the effects of hypoxia on several plasma variables.

**Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology**, v. 301, n. 2, p. 169–76, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14743516>>.

VERDADE, V. K.; VALDUJO, P. H.; CARNAVAL, A. C.; et al. A leap further : the Brazilian Amphibian Conservation Action Plan. **Alytes**, v. 29, n. 1–4, p. 28–43, 2012.

VILSEN, B.; ANDERSEN, J. P. Deduced amino acid sequence and E1-E2 equilibrium of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase of frog skeletal muscle comparison with the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of rabbit fast twitch muscle. **FEBS Letters**, v. 306, n. 2–3, p. 213–218, 1992.

VINOGRADOVA, T. M.; SUKHOVA, G. S.; TUMANOV, A. I.; et al.. JO001 a 2000 li. v. II, p. 356–358, 1991.

WALTON, M. Division of comparative physiology and biochemistry , society for integrative and comparative biology relationships among metabolic , locomotory , and field measures of organismal performance in the fowler toad ( *Bufo woodhousei fowleri* ) Author ( s ). n. May, 1988.

WASSERSUG, R. J.; PAUL, R. D.; FEDER, M. E. Cardio-respiratory synchrony in anuran larvae (*Xenopus laevis*, *pachymedusa dacnicolor*, and *Rana berlandieri*). **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 70, n. 3, p. 329–334, 1981.

WIER, W. G. Cytoplasmic [Ca<sup>2+</sup>] in mammalian ventricle: dynamic control by cellular processes. **Annual Review of Physiology**, v. 52, p. 467–485, 1990.

WILL, H.; KÜTTNER, I.; KEMSIES, C.; et al. Comparative analysis of phospholamban

phosphorylation in crude membranes of vertebrate hearts. **Experientia**, v. 41, n. 8, p. 1052–1054, 1985.

WILL, H.; KÜTTNER, I.; VETTER, R.; et al. Early presence of phospholamban in developing chick heart. **FEBS Letters**, v. 155, n. 2, p. 326–330, 1983.

WILLIAMS, C. J. A.; ALSTRUP, A. K. O.; BERTELSEN, M. F.; et al. When local anesthesia becomes universal: pronounced systemic effects of subcutaneous lidocaine in bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 209, p. 41–46, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.019>>.

WITHERS, P. C.; HEDRICK, M. S.; DREWES, R. C.; et al. Pulmonary compliance and lung volume are related to terrestriality in anuran amphibians. **Physiological and biochemical zoology : PBZ**, v. 87, n. 3, p. 374–83, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769702>>.

WITHERS, P. C.; HILLMAN, S. S. Allometric and ecological relationships of ventricle and liver mass in anuran amphibians. **Functional Ecology**, v. 15, n. 1, p. 60–69, 2001.

WOHLFART, B.; NOBLE, M. I. M. The cardiac excitation - contraction cycle. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, p. 1–43, 1982.

XUE, X. H.; HRYSHKO, L. V.; NICOLL, D. A.; et al. Cloning, expression, and characterization of the trout cardiac Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchanger. **The American journal of physiology**, v. 277, n. 4, p. C693–C700, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516099>>.

YODER, H. R.; COGGINS, J. R. Helminth communities in five species of sympatric amphibians from three adjacent ephemeral ponds in southeastern Wisconsin. **The Journal of parasitology**, v. 93, n. 4, p. 755–60, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17918353>>.

ZENA, L. A.; GARGAGLIONI, L. H.; B??CEGO, K. C. Temperature effects on baroreflex control of heart rate in the toad, *Rhinella schneideri*. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 179, p. 81–88, 2015.  
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.09.027>>.

## ANEXO 1

Pró Reitoria  
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



São Carlos, 17<sup>th</sup> April 2015

# CERTIFIED

We certify that the Research "Analysis of the occurrence and functionality of the sarcoplasmic reticulum in native frogs: *Rhinella* sp. and *Scinax* sp", protocol number CEUA 4225240315, utilizing 40 Amphibians (40 males), under the responsibility Raquel Fernanda Salla, was approved in the meeting of day 04/16/2015, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of Federal University of São Carlos.

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise da ocorrência e funcionalidade do retículo sarcoplasmático em anuros nativos: *Rhinella* sp. e *Scinax* sp.", protocolado sob o CEUA nº 4225240315, utilizando 40 Anfíbios (40 machos), sob a responsabilidade de Raquel Fernanda Salla, foi aprovado na reunião de 16/04/2015, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos.

yours faithfully,

Azair Liane Matos do Canto de Souza  
Coordinator of the Ethics Committee on Animal Use  
Federal University of São Carlos