

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

Eliton da Silva Vasconcelos

**Análise da Expressão de Proteínas Envolvidas no Manejo de Cálcio Cardíaco
nos Répteis Píton (*Python molurus*), Cascavel Sul-Americana (*Crotalus
durissus terrificus*) e Jacaré-de-Papo-Amarelo (*Caiman latirostris*)
em Jejum e nos Períodos Digestivo e Pós-Absortivo**

**São Carlos-SP
2014**

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

Eliton da Silva Vasconcelos

**Análise da Expressão de Proteínas Envolvidas no Manejo de Cálcio Cardíaco
nos Répteis Píton (*Python molurus*), Cascavel Sul-Americana (*Crotalus
durissus terrificus*) e Jacaré-de-Papo-Amarelo (*Caiman latirostris*)
em Jejum e nos Períodos Digestivo e Pós-Absortivo**

**Tese apresentada ao Programa
Interinstitucional de Pós Graduação em
Ciências Fisiológicas (PIPGCF UFSCar –
UNESP), como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Fisiológicas.**

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin

**São Carlos-SP
2014**

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

V331ae

Vasconcelos, Eliton da Silva.

Análise da expressão de proteínas envolvidas no manejo de cálcio cardíaco nos répteis píton (*Python molurus*), cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*) e jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em jejum e nos períodos digestivo e pós-absortivo / Eliton da Silva Vasconcelos. -- São Carlos : UFSCar, 2015.

87 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Fisiologia comparada. 2. SERCA2a. 3. Fosfolambam. 4. Trocador sódio-cálcio. 5. *Western blotting*. 6. Manejo cardíaco de cálcio. I. Título.

CDD: 591.1 (20^a)

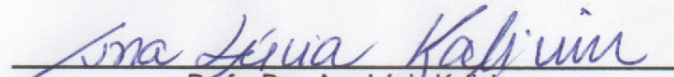


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


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

Folha de Aprovação

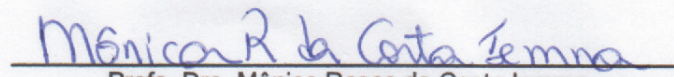
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Eliton da Silva Vasconcelos, realizada em 18/12/2014:



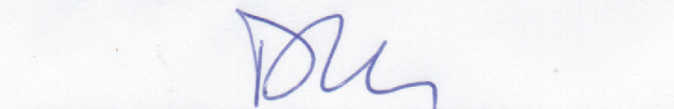
Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin
UFSCar



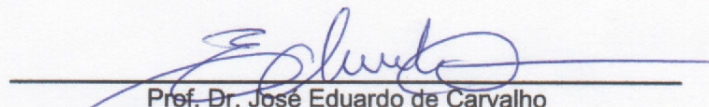
Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
UNESP



Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa lemma
UFSCar



Prof. Dr. David J. Mckenzie
UM2



Prof. Dr. José Eduardo de Carvalho
UNIFESP

“A simplicidade é o último
grau de sofisticação.”

(Leonardo da Vinci)

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin, pela confiança, incentivo, atenção, paciência e pela dedicação na minha formação acadêmico-científica durante todos esses anos. Mas, agradeço principalmente a amizade, em todos os momentos.

Ao prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin pelo apoio e por colocar à disposição seu laboratório, além dos seus ensinamentos e inestimável colaboração.

Aos amigos do laboratório, Rafael Z, Nathan, Lucas, Tiaguinho, Felipe Rocco, Diana, Vivian, Seu Ângelo, Samuel, Nicolás e Gabrielle pela ajuda, pelas boas risadas e também pelo aprendizado.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas pela ajuda e pela amizade.

À Capes pelo financiamento da pesquisa.

Ao Jacarezário do Departamento de Zoologia da UNESP - Rio Claro por ceder os animais utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes do Departamento de Genética e Evolução e a Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira do Departamento de Química, por disponibilizarem os equipamentos que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha esposa Edna, pelo carinho, amor, paciência, compreensão e pelo apoio incondicional durante todos esses anos.

À minha família: minha mãe Corina, meu irmão Everton, minha cunhada Andrea, meus sobrinhos Lucas, Gabriel e Bianca, minha tia Creuza, sem vocês tudo seria mais difícil, vocês são meus heróis.

RESUMO

As proteínas Ca^{2+} -ATPase do Retículo Sarcoplasmático (SERCA2), Fosfolambam (PLB) e o Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) são fundamentais para o manejo do cálcio e a contratilidade miocárdica nos vertebrados. A elevação da taxa metabólica gerada a partir dos processos mecânicos e fisiológicos da digestão é conhecida como "ação dinâmica específica" (SDA) e representa o custo energético do processamento, digestão e absorção dos alimentos. Em vários grupos de répteis, a alimentação gera um rápido aumento nas taxas de troca gasosa, cujo pico ocorre geralmente um dia ou dois após a alimentação, antes de sofrer um declínio mais lento e retornar aos valores pré-prandiais. A ingestão de grandes massas de alimento demanda uma elevação metabólica e leva a uma compensação na massa ventricular e um aumento na força de contração do miocárdio, evitando uma sobrecarga no sistema cardiovascular. Durante o jejum ocorre depleção da estrutura corpórea podendo também atingir o músculo cardíaco. Para descrever a importância e as mudanças nas proteínas SERCA2, PLB e NCX diante os efeitos da alimentação/digestão nos répteis cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*), na píton (*Python molurus*) e também do jejum prolongado no jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), utilizada a técnica molecular Western blotting. Observou-se a existência de homologia entre as proteínas dos répteis com relação aos mamíferos. A SDA levou a uma maior expressão da proteína SERCA2 nas três espécies de répteis. A SDA também pode ter induzido a expressão de uma isoforma e/ou uma menor fosforilação em alguns sítios ativos da SERCA2 no tecido ventricular de *P. molurus*. Uma relação direta entre a expressão da SERCA2 com a expressão do PLB foi verificada somente em *C. durissus*, não havendo tal relação em *P. molurus* e *C. latirostris*. As três espécies de répteis expressaram o PLB com mesma massa molecular, de 50 kDa, e diferente da do rato, que é de 25 kDa. A grande distância evolutiva que separa os répteis dos mamíferos pode ter ocasionado o surgimento de isoformas entre esses grupos, explicando tal diferença. O aumento da expressão do NCX em *C. latirostris* do grupo alimentar Digestão sugere uma maior mobilização do cálcio e um maior inotropismo de forma frequência-específica através dessa proteína. A maior expressão do NCX juntamente com a menor expressão da SERCA2 e do PLB em *C. durissus* no grupo alimentar Jejum em relação aos outros dois grupos alimentares sugere uma maior mobilização do cálcio pelo NCX nesse regime de alimentação, o que seria vantajoso do ponto de vista energético. A expressão do NCX com diferentes massas moleculares entre as três espécies estudadas, um menor número de regiões conservadas em animais filogeneticamente mais distantes, e a grande plasticidade do gene da proteína NCX em formar proteínas distintas, sugere a expressão de proteínas isoformas nos répteis estudados.

Palavras chaves: SERCA2, Fosfolambam, NCX, Western blotting, Manejo cardíaco de cálcio, *Caiman latirostris*, *Crotalus durissus terrificus*, *Python molurus*.

ABSTRACT

The Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA), phospholamban (PLB) and the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX) proteins are essential for the cardiac calcium management and myocardial contractility in vertebrates. The increase in metabolic rate generated from mechanical and physiological process of digestion is known as “specific dynamic action” (SDA) and represents the energy cost of processing, digestion and absorption of food. In several groups of reptiles, feeding generates a rapid increase in rates of gas exchange, whose peak usually occurs one or two days after feeding, before suffering a slower decline and returning to preprandial values. Ingestion of large quantity of food demands a metabolic elevation and leads to indemnities related in ventricular mass and an increase in myocardial force contraction, avoiding an overload on the cardiovascular system. During the fasting, depletion of body mass occurs and it can also reach the heart muscle. To describe the importance and the changes in SERCA2, PLB and NCX proteins on the effects of feeding/digestion in reptiles broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*), burmese python (*Python molurus*) and also by prolonged fasting in South-American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) Western blotting technique was used. We observed the homology existence between the proteins of reptiles in relation to mammals. The SDA increased expression of SERCA2 protein in three species of reptiles. The SDA can also have unduced the expression of an isoform and/or reduced phosphorylation at some active sites of SERCA2 in ventricular tissue of *P. molurus*. A direct relationship between the expression of SERCA2 with the PLB expression in *C. durissus* was observed. However in *P. molurus* and *C. latirostris* this relation does not exist. The three reptiles expressed the PLB with molecular mass of 50 kDa, whereas the mouse expressed 25 kDa. The vast evolutionary distance that separates mammals of reptiles may have caused the rise of isoforms between these groups, explaining this difference. The increased expression of NCX along with lower expression of SERCA2 and PLB in *C. durissus* in food group Fasting compared to the other two groups suggests a higher calcium mobilization in this feeding regime, which would be advantageous from the energy point of view. The expression of NCX with different molecular mass between the three species, a smaller number of consensus regions with the animals phylogenetically more distant and the great plasticity of NCX gene to form distinct proteins, suggest the expression of proteins isoforms with the reptiles studied in this research.

Key words: SERCA2, Phospholamban, NCX, Western blotting, Cardiac calcium management, *Caiman latorostris*, *Crotalus durissus terrificus*, *Python molurus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do coração e dos vasos conectores do taxa Craniata (Adaptada de SCHMIDT-RHAESA, 2007).....	5
Figura 2. Genes envolvidos no desenvolvimento do coração. A figura mostra a relação evolutiva entre os animais em função dos números de genes cardíacos regulatórios que são expressos em cada estrutura cardíaca de cada organismo (Adaptada de OLSON et al., 2006).....	6
Figura 3. Representação esquemática do sistema circulatório de répteis crocodilianos (Adaptada de HILL et al., 2012).....	7
Figura 4. Representação esquemática do sistema circulatório de répteis não-crocodilianos (Adaptada de HILL et al., 2012).....	7
Figura 5. A. Répteis não crocodilianos têm dois átrios e três câmaras ventriculares incompletamente separadas. B. Vista diagramática do fluxo sanguíneo através do coração de um réptil não crocodiliano. (Adaptada de MOYES & SCHULTE, 2010).....	8
Figura 6. Principais mecanismos envolvidos no processo de acoplamento excitação-contração no músculo cardíaco de mamíferos. SR - retículo sarcoplasmático; NCX - trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; ATPase; I_{Ca} - corrente de Ca^{2+} por meio de canais tipo L; PLB, fosfolambam; RyR, canais de rianodina (Adaptada de BERS, 2002).....	11
Figura 7. Geração das múltiplas isoformas através do splicing alternativo dos genes ATP2A1-3 de humanos (Adaptada de BRINI & CARAFOLI, 2009).	12
Figura 8. Modelo estrutural da proteína fosfolambam (PLB) desfosforilada (esquerda) e fosforilada (direita) com dois fosfatos (P^{\ominus}) incorporados por monômero (Adaptada de SIMMERMAN & JONES, 1998).	14
Figura 9. Modelo estrutural da proteína NCX mostrando os nove segmentos transmembrana (Adaptada de DIPOLO & BEAUGÉ, 2006).....	16
Figura 10. Perfis metabólicos pós-prandiais de seis espécies de répteis. Note os aumentos de 3 a 15 vezes na taxa metabólica em 1 ou 2 dias após a alimentação (Adaptada de SECOR, 2009).....	21
Figura 11. Exemplar de píton, <i>Python molurus</i> , utilizada no presente estudo (CIPRIANO, 2012).....	23
Figura 12. Exemplar de cascavel, <i>Crotalus durissus terrificus</i> (OTANI, 2013).....	25
Figura 13. Exemplos de jacaré-de-papo-amarelo, <i>Caiman latirostris</i> (LEITE, 2009).....	27
Figura 14. Esquema mostrando o “sanduíche” de transferência utilizado na cuba de eletroforese.....	36

Figura 15. Análise da expressão proteica por SDS-PAGE (coluna da esquerda) da SERCA2 (Figura A), do PLB (Figura B), e do NCX (Figura C) e por Western blotting (coluna da direita) da SERCA2 (Figura D), do PLB (Figura E) e do NCX (Figura F) em ventrículo (v) e átrio (a) dos grupos alimentares Digestão e Pós-absortivo da píton (<i>Python molurus</i>) e em ventrículo esquerdo do Rato Wistar (<i>Rattus Norvegicus</i>).....	40
Figura 16. Análise da expressão proteica por SDS-PAGE (coluna da esquerda) da SERCA2 (Figura A), do PLB (Figura B), e do NCX (Figura C) e por Western blotting (coluna da direita) da SERCA2 (Figura D), do PLB (Figura E) e do NCX (Figura F) em ventrículo dos grupos alimentares Digestão, Jejum e Pós-absortivo da cascavel sul-americana (<i>Crotalus durissus terrificus</i>) e em ventrículo esquerdo do Rato Wistar (<i>Rattus Norvegicus</i>).....	42
Figura 17. Análise da expressão proteica por SDS-PAGE (coluna da esquerda) da SERCA2 (Figura A), do PLB (Figura B), e do NCX (Figura C) e por Western blotting (coluna da direita) da SERCA2 (Figura D), do PLB (Figura E) e do NCX (Figura F) em átrio dos grupos alimentares Digestão, Jejum e Pós-absortivo da cascavel sul-americana (<i>Crotalus durissus terrificus</i>) e em ventrículo esquerdo do Rato Wistar (<i>Rattus Norvegicus</i>).....	43
Figura 18. Análise da expressão proteica por SDS-PAGE (coluna da esquerda) e por Western blotting (coluna da direita) da SERCA2 (A), PLB (B), e do NCX (C), no ventrículo (v) e átrio (a) dos grupos alimentares Digestão e Pós-absortivo do jacaré-de-papo-amarelo (<i>Caiman latirostris</i>) e em ventrículo esquerdo do Rato Wistar (<i>Rattus Norvegicus</i>).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do gel resolving de poliacrilamida com as densidades específicas para cada proteína (7,5% para NCX e SERCA2 e 12% para PLB). Quantidades referentes à confecção de 2 géis de 1,5mm de espessura no sistema Mini-Protean (Bio-Rad®).....	34
Tabela 2. Valores da quantificação das proteínas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) nos tecidos atrial e ventricular de <i>P. molurus</i> em cada regime alimentar experimental.....	39
Tabela 3. Valores da quantificação das proteínas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) nos tecidos atrial e ventricular de <i>C. durissus terrificus</i> em cada regime alimentar experimental.....	41
Tabela 4. Valores da quantificação das proteínas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) nos tecidos atrial e ventricular de <i>C. latirostris</i> em cada regime alimentar experimental.....	44
Tabela 5. Nomes das espécies, números de acesso das sequências nos bancos de dados GenBank e UniProt e os tipos e número (n) de possíveis sítios ativos identificados na análise da proteína SERCA2 no banco de dados PROSITE.....	48
Tabela 6. Nomes das espécies, números de acesso das sequências nos bancos de dados GenBank e UniProt e os tipos e número (n) de possíveis sítios ativos identificados na análise da proteína PLB no banco de dados PROSITE....	49
Tabela 7. Nomes das espécies, números de acesso das sequências nos bancos de dados GenBank e UniProt e os tipos e número (n) de possíveis sítios ativos identificados na análise da proteína NCX1 no banco de dados PROSITE..	50

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A evolução do coração.....	3
1.2. O coração dos répteis.....	6
1.3. A contração do músculo cardíaco.....	9
1.4. Ação dinâmica específica (SDA).....	18
1.5. Metabolismo de répteis e implicações na fisiologia cardíaca.....	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. Gerais.....	22
2.2. Específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Os animais.....	23
3.1.1. A píton (<i>Phyton molurus</i>).....	23
3.1.2. A cascavel sul-americana (<i>Crotalus durissus terrificus</i>).....	24
3.1.3. O jacaré-de-papo-amarelo (<i>Caiman latirostris</i>).....	26
3.2. Métodos.....	28
3.2.1. Regimes alimentares.....	29
3.2.2. Sacrifício e coleta de tecidos.....	30
3.2.3. Western blotting.....	30
3.2.4. Homogeneização do músculo cardíaco.....	31
3.2.5. Quantificação de proteína.	32
3.2.6. Eletroforese.....	33

3.2.7. Transferência.....	35
3.2.8. Incubação com anticorpos.....	36
3.2.9. Revelação das membranas.....	38
3.2.10. Análise molecular.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Expressão das proteínas SERCA2, PLB e NCX.....	39
4.2. Expressão proteica em píton (<i>Python molurus</i>).....	39
4.3. Expressão proteica em cascavel sul-americana (<i>Crotalus durissus terrificus</i>).....	41
4.4. Expressão proteica em jacaré-de-papo-amarelo (<i>Caiman latirostris</i>).....	43
4.5. Análise molecular da SERCA2, do PLB e do NCX.....	45
5. DISCUSSÃO.....	51
5.1. Análise da expressão proteica da SERCA2.....	51
5.2. Análise da expressão proteica do PLB.....	55
5.3. Análise da expressão proteica do NCX.....	57
5.4. Análise molecular da expressão das proteínas SERCA2, PLB e NCX.....	63
6. CONCLUSÕES.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
8. ANEXOS.....	81

1. INTRODUÇÃO

Biodiversidade é o termo que descreve o conjunto de todos os seres vivos, os ecossistemas em que vivem e os processos biológicos dos quais fazem parte. A humanidade depende de tal diversidade, utilizando-a como recursos alimentares e farmacêuticos, a qual apresenta um grande potencial para fornecer outros benefícios ainda desconhecidos (WILSON, 1997).

Apesar de 250 anos de classificação taxonômica e mais de 1,2 milhões de espécies catalogadas, cerca de 86% das espécies terrestres e 91% das espécies aquáticas ainda não foram descritas (MORA et al., 2011). As projeções para o número absoluto de espécies variam entre 5 e 30 milhões de organismos, muitos dos quais não serão sequer conhecidos pela humanidade, dado ritmo de destruição acelerado (IUCN, 2010).

A esperada riqueza de adaptações em todos os níveis de organização biológica dos vertebrados basais (de moléculas a órgãos altamente especializados) deve ser encarada como potencial de biodiversidade a ser explorado, principalmente para os fisiologistas comparativos, para os quais a adaptação consiste na principal ferramenta de trabalho.

Os membros da classe parafilética Reptília, que incluem os primeiros vertebrados terrestres são diversificados e abundantes, com cerca de 7.000 espécies que ocupam uma grande variedade de habitats terrestres a aquáticos. Os répteis atuais compreendem duas das três linhagens de vertebrados amniotas, que se originaram de tetrápodes semelhantes a anfíbios existentes no final da era Paleozóica. Estas duas linhagens são os amniotas anápsidos, representados pelas tartarugas, e os amniotas diápsidos, representados pelos lagartos, cobras, crocodilianos e tuataras. Eles são os sobreviventes da imensa irradiação de amniotas mesozóicos que incluem os dinossauros, cuja grande maioria extinguiu-se ao final da era Mesozóica. Na sua definição tradicional, a classe Reptilia é um grupo parafilético, pois exclui as aves, que são descendentes do ancestral comum da linhagem diápsida. A terceira linhagem de amniotas, os sinápsidos, deu origem aos mamíferos atuais (HICKMAN et al., 2001).

A compreensão da trajetória de 300 milhões de anos de vida dos répteis torna-se complicada devido à existência de evolução paralela e evolução convergente, muito comum entre as diversas linhagens e, também, devido às grandes descontinuidades do registro fóssil (HICKMAN et al., 2001).

É imprescindível entender a fisiologia de um maior número de espécies, pois só desta maneira poderemos explorar economicamente, e de uma maneira sustentável, a riqueza genética existente nestas comunidades e defender a conservação das áreas em que habitam os organismos estudados de uma forma mais eficaz. Para aperfeiçoar a representação, precisamos de um melhor entendimento de como funcionam populações naturais dessas espécies, e o conhecimento do sistema fisiológico é fundamental para organizar os esforços de conservação de suas populações remanescentes.

A história evolutiva dos vertebrados basais (peixes, anfíbios e répteis) é, no mínimo, 100 milhões de anos mais antiga do que a história evolutiva dos mamíferos, o que deve implicar em uma maior diversidade morfofisiológica, uma vez que foram expostos durante muito mais tempo às pressões seletivas dos diferentes ambientes que ocuparam (HICKMAN et al., 2001).

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

O coração dos vertebrados ectotérmicos está mais sujeito a grandes variações nas taxas extracelulares de gases dissolvidos, balanço ácido-base e temperatura do que o coração dos vertebrados endotérmicos. Isso se deve, principalmente, a fatores como flutuações ambientais, hábitos e organização do sistema cardiovascular desses animais (DRIEDZIC & GESSER, 1994).

De acordo Hickman et al. (2001) a diversidade morfofisiológica da célula cardíaca apresentada pelas diferentes classes de vertebrados, bem como as variações encontradas dentro de uma mesma classe, mostram quão diversos podem ter sido os caminhos evolutivos percorridos durante a formação de aparatos cardíacos que apresentam tais particularidades espécie-específicas.

O conhecimento dos processos envolvidos na contração cardíaca evoluiu muito nos últimos 20 anos. Porém, a maior parte dos estudos se dedicaram ao conhecimento da fisiologia dos miócitos cardíacos de mamíferos e pouco se sabe sobre os vertebrados basais. Desta forma, o estudo da fisiologia de grupos ainda pouco explorados como os répteis é de fundamental importância para o

conhecimento desses animais e, dessa maneira, defender não somente as diferentes espécies dos riscos de extinção, mas também a conservação de seus habitats de uma forma mais eficaz.

1.1. A evolução do coração

A formação de órgãos e outras partes do corpo dos seres vivos ocorrem através de passos sucessivos, controlados por genes reguladores que organizam células especializadas em complexas estruturas tridimensionais. Estudos genéticos do desenvolvimento do coração, tanto de vertebrados quanto de invertebrados, têm revelado uma rede evolutiva de genes conservados que consiste de interconexões funcionais entre fatores de transcrições miogênicos, desde os genes a jusante (downstream) até as vias sinalizadoras a montante (upstream). Tais genes controlam e direcionam o destino das células, a diferenciação dos miócitos e a morfogênese cardíaca (CRIPPS & OLSON, 1998; BODMER, 1995).

A comparação entre os genes envolvidos no desenvolvimento do coração de animais com uma vasta distância filogenética suporta a ideia de que as modificações evolutivas do coração, com o aumento da complexidade, ocorreu através da modificação e da expansão de genes ancestrais responsáveis por codificar e regular o desenvolvimento cardíaco. A expansão desses fatores genéticos, tanto através da duplicação quanto da adição de novos genes, provavelmente permitiu o aparecimento de novas estruturas acessórias como câmaras, válvulas e um eficiente sistema de condução (FISHMAN & OLSON, 1997).

A principal unidade funcional do coração são as células musculares cardíacas, que expressam um conjunto de proteínas contráteis, tal como actina, miosina, troponina e tropomiosina. O aparecimento de células musculares antecedeu a divergência dos cnidários (hidra, água-viva e corais), ctenóforos e dos bilatéria (~ 700 milhões de anos atrás) (OOTA & SAITOU, 1999).

Células musculares primordiais provavelmente assemelhavam-se às células do epitélio muscular dos cnidários e anfióxos, sendo estes últimos os organismos invertebrados vivos mais próximos dos ancestrais dos vertebrados (BISHOPRIC, 2005; GRENS et al., 1996). Essas células provavelmente existiram em uma bolsa gástrica primitiva onde, através de movimentos de líquidos, participavam do processo de alimentação. Células musculares em bilatérios são derivadas do

mesoderma e acredita-se que tenham surgido da gastroderme de um diploblástico ancestral. A diversificação das células musculares originou as células musculares esqueléticas, cardíacas e lisas, promoveu uma maior especialização das células do músculo cardíaco e finalmente resultou nos miócitos atrial e ventricular, bem como nas células do sistema de condução cardíaco dos mamíferos (OLSON, 2006).

Acredita-se que o primeiro órgão como um coração tenha surgido cerca de 500 milhões de anos atrás, em um ancestral bilatério (BISHOPRIC, 2005, ROMER, 1967; MOORMAN & CHRISTOFFELS, 2003; SIMÕES-COSTA et al., 2005). Provavelmente esse órgão se assemelhava a um simples vaso tubular, como os órgãos de tunicados e anfioxos, que contém uma camada de células epiteliais, sem câmaras e vasos definidos (OLSON, 2006).

Durante a evolução, o coração passou de um tubo com uma simples camada celular com contratilidade peristáltica, para uma poderosa e eficiente bomba com uma espessa câmara muscular dedicada a receber (átrio) e bombear (ventrículo) sangue, exibindo contrações síncronas e ligações diretas com um sistema vascular fechado (MOORMAN & CHRISTOFFELS, 2003, SIMÕES-COSTA et al., 2005).

A transição do ambiente aquático para o ambiente terrestre exigiu várias adaptações e, no caso do coração, a separação do sangue oxigenado do sangue venoso. Os peixes possuem um coração tipo tubo, composto por 4 câmaras em série: seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo (ou cone). Um tronco arterioso se ramifica para o interior dos arcos branquiais, a partir dos quais vasos levam o sangue arterializado para a cabeça e para o corpo, suprindo os diversos órgãos, dos quais o sangue volta para o seio venoso (OLSON, 2006).

As larvas de anfíbios já possuem 2 átrios. Com o crescimento do pulmão durante o desenvolvimento dos anfíbios, a primeira veia branquial se dirige para o pulmão. O ventrículo, sem divisão, bombeia uma mistura de sangue, com porções de sangue venoso vindo do corpo e de sangue arterializado vindo do pulmão, para a circulação sistêmica. Nos amniota, há uma forte tendência de separação do ventrículo em duas câmaras, que é convergentemente completa em aves e mamíferos. Esta tendência levou à redução no número dos vasos branquiais primitivos (SCHMIDT-RHAESA, 2007), como mostrado na figura 1.

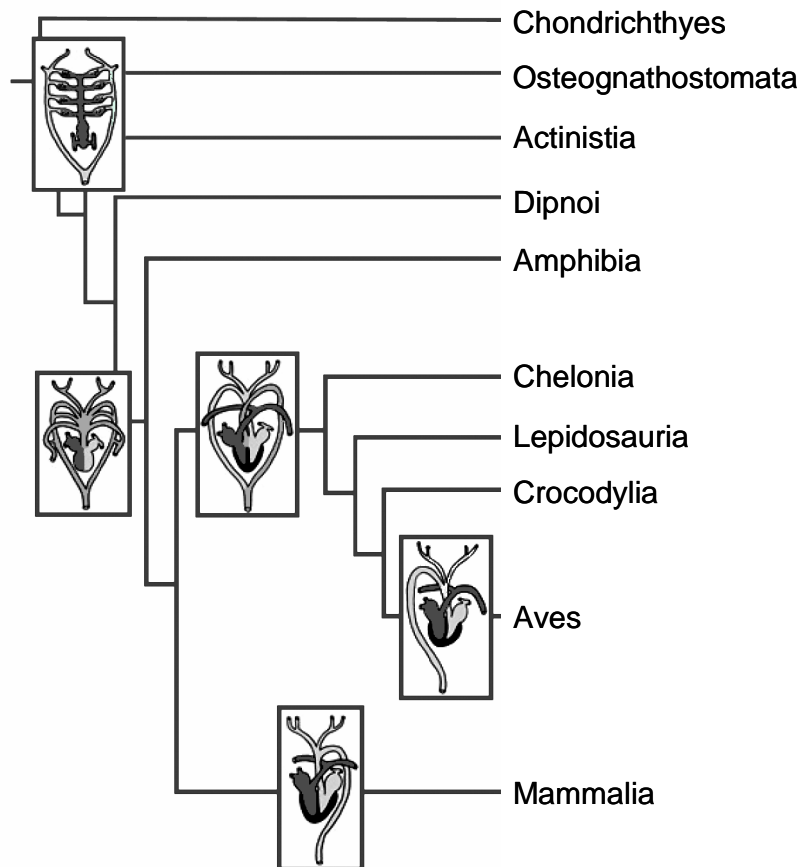


Figura 1. Representação esquemática do coração e dos vasos conectores do taxa Craniata (Adaptada de SCHMIDT-RHAESA, 2007).

A eficiência do fluxo sanguíneo unidirecional dentro e fora do coração foi assegurada pelo aparecimento das válvulas. A conversão de um tubo primitivo do coração para um coração com várias câmaras que direciona o sangue com alta força e eficiência através de contrações sincrônicas requer um sistema de condução. Outros avanços evolutivos do coração de vertebrados incluem as células da crista neural, que contribuem na formação do septo e do trato de saída, a trabécula, que aumenta a oxigenação, o endotélio, que proporciona sinais de fatores de crescimento e células precursoras para a formação das válvulas cardíacas, e o epicárdio, que fornece precursores para a vascularização coronária (OLSON, 2006).

Num contexto genético, o desenvolvimento do coração é controlado por um conjunto de genes, fatores de transcrição evolutivamente conservados (NK2, MEF2, GATA, Tbx, e Hand), que controlam o destino das células cardíacas, a expressão dos genes que codificam proteínas de contratilidade e a morfogênese da estrutura cardíaca (Figura 2). Esses genes sinalizadores e receptores selecionam um grupo de fatores de transcrição relacionados ao desenvolvimento do coração. Eles codificam proteínas de diversas famílias especializadas em regular a expressão de

vários outros genes, incluindo os próprios genes sinalizadores, reguladores e estruturais (CRIPPS & OLSON, 1998; BUCKINGHAM et al., 2005; SRIVASTAVA & OLSON, 2000; BRUNEAU, 2002). Os fatores de transcrição cardíacos são proteínas regulatórias com importância em múltiplos processos da embriogenia cardíaca.

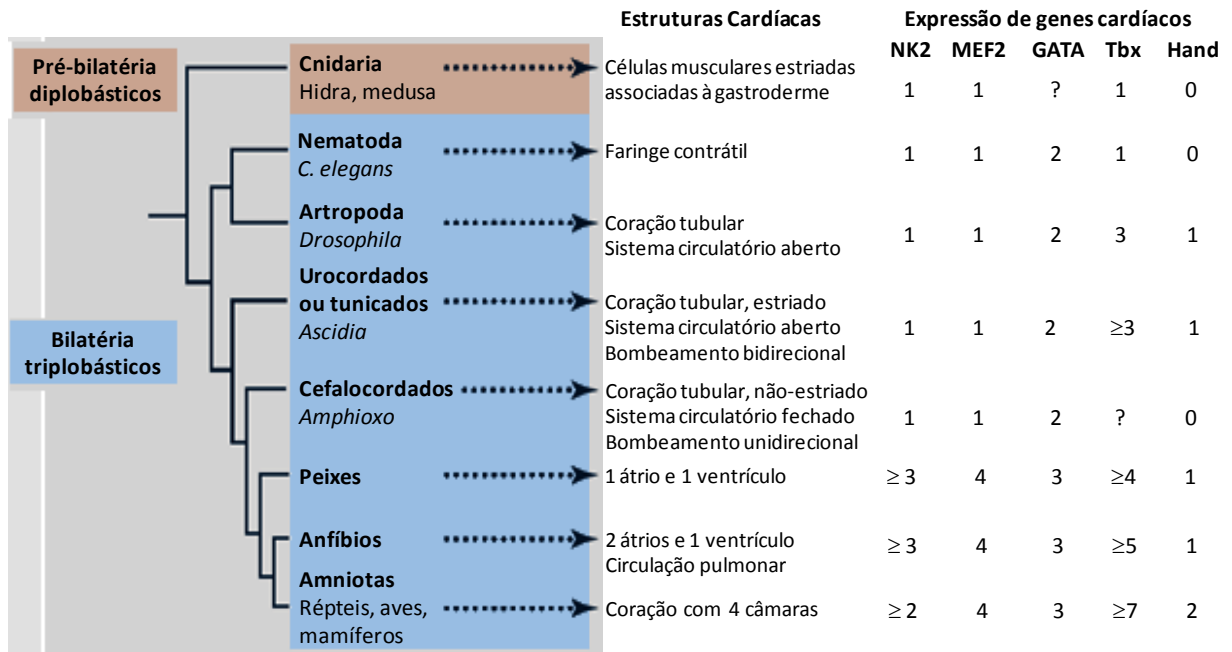


Figura 2. Genes envolvidos no desenvolvimento do coração. A figura mostra a relação evolutiva entre os animais em função dos números de genes cardíacos regulatórios que são expressos em cada estrutura cardíaca de cada organismo (Adaptada de OLSON et al., 2006).

1.2. O coração dos répteis

Em todos os répteis, o átrio direito, que recebe sangue venoso do corpo é completamente separado do átrio esquerdo, que recebe sangue arterial dos pulmões. Os crocodilianos (crocodilos, jacarés, aligatores e o gavial) possuem dois ventrículos completamente separados (Figura 3), enquanto que os demais répteis possuem ventrículos parcialmente separados (Figura 4).

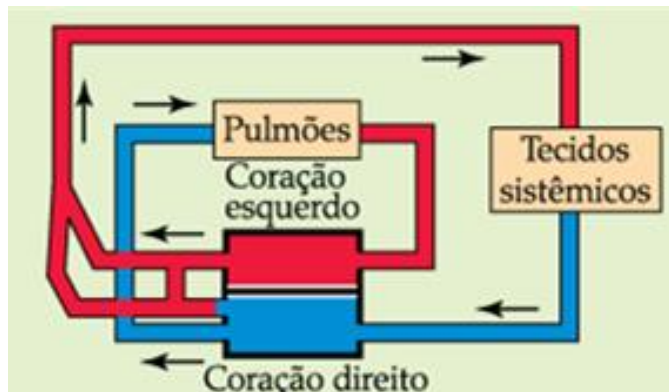


Figura 3. Representação esquemática do sistema circulatório de répteis crocodilianos (Adaptada de HILL et al., 2012).

Porém, mesmo nos répteis com separação incompleta dos ventrículos, o padrão de fluxo de sangue dentro do coração previne a mistura de sangue pulmonar (oxigenado) e sistêmico (desoxigenado). Desta forma, todos os répteis possuem duas circulações funcionalmente separadas. (SCHMIDT-RHAESA, 2007).

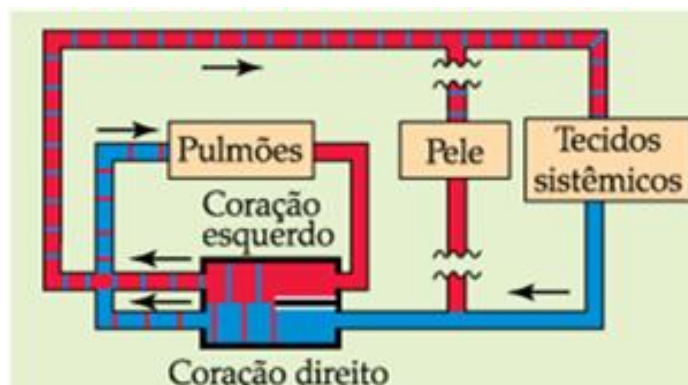


Figura 4. Representação esquemática do sistema circulatório de répteis não-crocodilianos (Adaptada de HILL et al., 2012).

Os vertebrados endotérmicos, também chamados de animais de “sangue quente” (aves e mamíferos) possuem elevadas taxas metabólicas, o que lhes permitem manter a temperatura corpórea constante, normalmente acima da temperatura ambiental. Os endotérmicos utilizam mais oxigênio e necessitam de mais substrato energético do que os ectotérmicos, ou animais de “sangue frio”, como peixes, anfíbios e lagartos, com temperaturas corpóreas mais baixas e variáveis. Porém, como consequência, os endotérmicos ganharam a capacidade de prolongar

atividades extenuantes que não podem ser atingidas pelos ectotérmicos (SUMMERS, 2005).

As aves e os mamíferos desenvolveram, de forma independente, corações de 4 câmaras divididos em dois lados, de forma que o sangue oxigenado vindo dos pulmões é separado do sangue desoxigenado vindo do restante do corpo. O coração de 3 câmaras da maioria dos répteis e anfíbios é mais flexível, permitindo a mistura controlada de sangue pulmonar e sistêmico (Figura 5), característica especialmente importante no mergulho, quando o desvio (“shunt”) de sangue dos pulmões acelera a transição para uma taxa metabólica mais baixa, aumentando o tempo entre respirações. (SUMMERS, 2005).

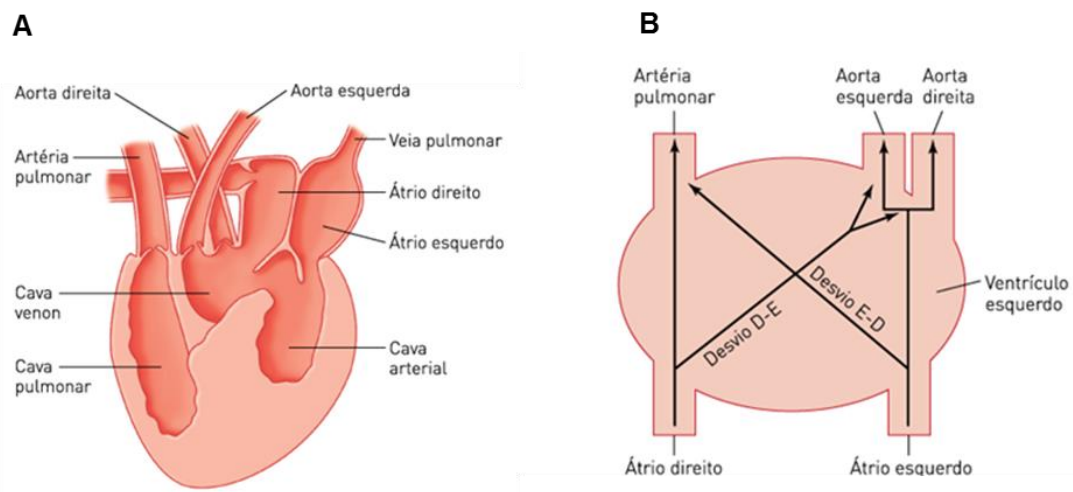


Figura 5. **A.** Répteis não crocodilianos têm dois átrios e três câmaras ventriculares incompletamente separadas. **B.** Vista diagramática do fluxo sanguíneo através do coração de um réptil não crocodiliano. (Adaptada de MOYES & SCHULTE, 2010).

Ainda de acordo com Summers (2005), uma crista muscular no coração de 3 câmaras pode separar completamente o sangue desoxigenado do oxigenado, de forma que a mera separação do fluxo de sangue não explica por que o coração de 4 câmaras é tão benéfico que tenha evoluído duas vezes. Contudo, no coração de 4 câmaras, a divisão do fluxo de sangue também permitiu a variação de pressão entre os sistemas circulatórios pulmonar e sistêmico. O lado que envia sangue para os pulmões é muito mais fraco que o outro lado, pois altas pressões nos pulmões poderiam causar vazamento de líquido através das membranas respiratórias. O lado mais forte do coração envia sangue para as artérias sistêmicas, onde as altas

pressões trabalham contra a alta resistência resultante das forças de contração musculares, múltiplos leitos capilares e extensiva filtração através dos rins. As pressões do sangue sistêmico dos endotérmicos modernos são 3 vezes superiores aquelas dos ectotérmicos.

O coração dos crocodilianos é um mosaico interessante: ele é dividido em 4 câmaras, mas também possui um sistema de desvio (“shunt”), embora um pouco diferente daquele dos demais répteis (Figura 4c). Seymour et al. (2004) propuseram que os ancestrais dos crocodilianos modernos foram endotérmicos e precisaram de um coração de 4 câmaras para a separação de pressão, que foi posteriormente re-evoluído em um sistema de desvio (“shunting”).

Conforme enfatizado por Johansen & Burggren (1980), o coração de um determinado vertebrado não é inferior ao de outro, mas sim, adaptado para que o animal tenha uma organização a ele apropriada e que apresente padrões bem definidos de comportamento e de interação com seu ambiente.

1.3. A contração do músculo cardíaco

O íon cálcio (Ca^{2+}) é o regulador central da contratilidade cardíaca, fundamental desde a geração e modulação da atividade elétrica (potencial de ação, PA) até a regulação e controle do processo de contração. Portanto, sua homeostase dentro da célula é fundamental para a função do miocárdio. A Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), o trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX), os canais de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (receptores de rianodina - RyRs) e os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (canais tipo L) são os principais responsáveis pela homeostase do Ca^{2+} intracelular no processo de acoplamento excitação-contração dos cardiomiócitos (BERS, 2002).

A despolarização da membrana (denominada sarcolema) ativa os canais de Ca^{2+} do tipo L da célula miocárdica, promovendo a entrada de Ca^{2+} no meio intracelular. Esse influxo de Ca^{2+} promove a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), principal estoque deste íon para a contração no miocárdio de mamíferos. A liberação de Ca^{2+} do RS é induzida pela ligação de Ca^{2+} nos canais de liberação, denominados receptores de rianodina (RyR) (FABIATO, 1983). A atividade dos RyR é regulada por proteínas quinases (PKA e CAMKII) e fosfatases (PP1 e PP2A) (REIKEN et al., 2003).

O aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} permite a difusão deste íon e sua ligação à troponina C, disparando o processo de contração celular e geração de força, explicada pela teoria dos filamentos deslizantes (HUXLEY, 1969). Portanto, em condições fisiológicas, a ativação elétrica (excitação) atua como o gatilho para a contração, e o aumento de Ca^{2+} intracelular é o fator que acopla os dois fenômenos. O conjunto desses processos é chamado acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C).

Para o relaxamento do músculo cardíaco ocorrer, vários transportadores de Ca^{2+} competem pela remoção desse íon do sarcoplasma, permitindo assim a dissociação do Ca^{2+} da troponina (BERS, 2002). Quatro mecanismos estão envolvidos no relaxamento muscular cardíaco: i) Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA), que capta o íon de volta para o interior da organela; ii) trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), que promove a extrusão do íon para o meio extracelular; iii) uniporter de Ca^{2+} mitocondrial, que medeia o fluxo do íon para dentro das mitocôndrias e iv) Ca^{2+} -ATPase da sarcolema (SL-ATPase), que também promove extrusão de Ca^{2+} (BERS, 2002) (Figura 6).

A participação relativa destes transportadores é dependente da espécie (BASSANI et al., 1994), da fase de desenvolvimento pós-natal (BASSANI & BASSANI, 2002) e pode estar alterada em certas condições fisiopatológicas (POGWIZD et al., 1999).

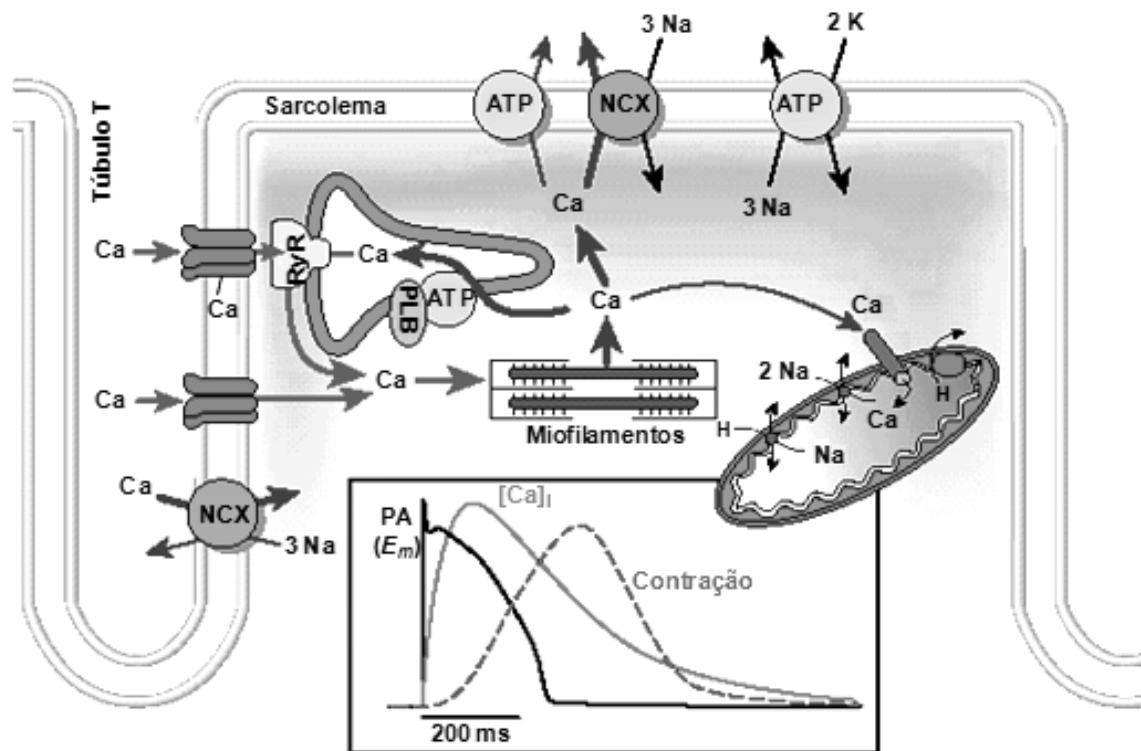


Figura 6. Principais mecanismos envolvidos no processo de acoplamento excitação-contrção no músculo cardíaco de mamíferos. SR - retículo sarcoplasmático; NCX - trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; ATPase; I_{Ca} - corrente de Ca^{2+} por meio de canais tipo L; PLB, fosfolambam; RyR, canais de rianodina (Adaptada de BERS, 2002).

A proteína SERCA possui uma massa molecular estimada em 100 KDa (BURK et al., 1989) e, em vertebrados, três genes estão presentes (*ATP2A1-3*), os quais codificam três proteínas isoformas, SERCA 1-3 (WUYTACK et al., 2002). Curiosamente, cada um desses genes sofre “splicing” alternativo, processo regulado durante a expressão gênica que resulta na codificação de múltiplas proteínas por um mesmo gene, resultando em onze proteínas SERCA: SERCA 1a/b, SERCA 2a/b/c e SERCA 3a/b/c/d/e/f (MARTIN et al., 2002) (Figura 7).

O gene da proteína SERCA está organizado em 21 éxons separados por 20 íntrons (HERZBERG & FERNÁNDEZ, 2002). O grande número de íntrons possibilita o aparecimento de variantes, e é através do splicing alternativo que a proteína SERCA2 dá origem as SERCA2b com 1042 aa, a uma variante menor, a SERCA2a com 997 aa (ALTSHULER et al., 2012) e a SERCA2c com 999 aa (GÉLÉBART et al., 2003).

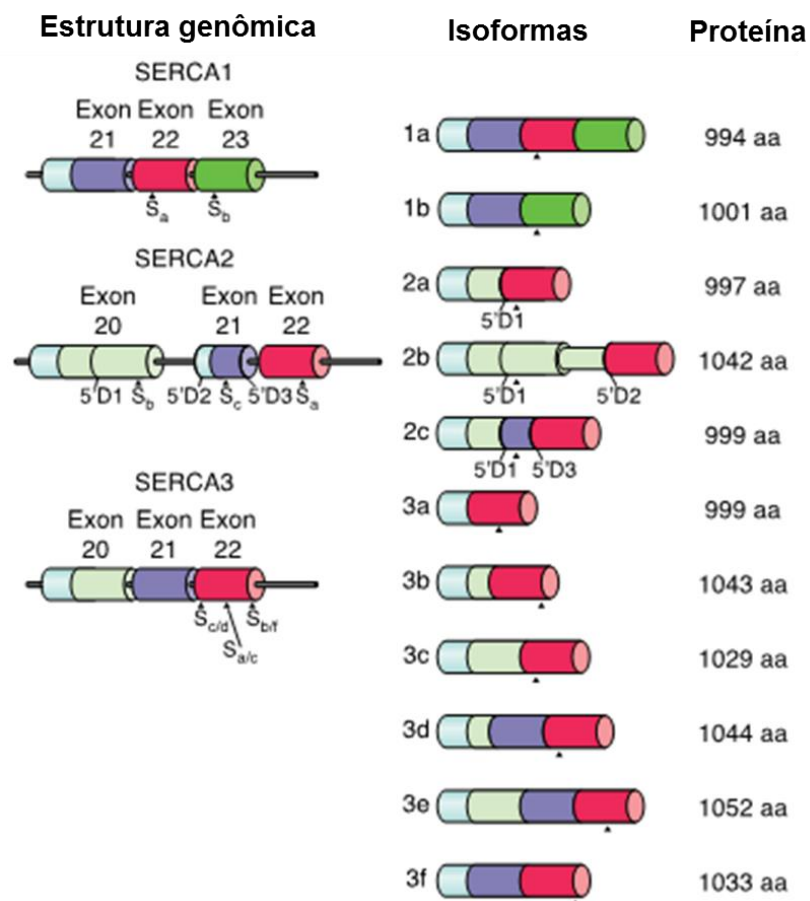


Figura 7. Geração das múltiplas isoformas através do splicing alternativo dos genes *ATP2A1-3* de humanos (Adaptada de BRINI & CARAFOLI, 2009).

Estas isoformas e suas variantes de splicing são expressas em diferentes tecidos. Por exemplo, as isoformas SERCA1a e SERCA1b são encontradas no músculo esquelético adulto e neonatal, respectivamente. A SERCA2a é expressa primariamente no músculo cardíaco e na musculatura esquelética de contração lenta, enquanto que a sua variante, a SERCA2b, é encontrada em quase todas as células não musculares e frequentemente é considerada uma variante de uma proteína de manutenção (“housekeeping”). Além disso, as SERCAs 3 e 2b são encontradas numa ampla gama de células incluindo linfócitos, mastócitos, células epiteliais, células endoteliais, como também nas células de Purkinje e no cerebelo (WUYTACK et al., 2002; CAMPBELL et al., 1991).

A SERCA2a encontra-se sob controle direto do fosfolambam (PLB), que é uma holoproteína, formada por 5 subunidades idênticas de baixo peso molecular. Esta proteína está presente no músculo liso e cardíaco (SIMMERMAN & JONES, 1998), e também em baixos níveis na musculatura esquelética de contração lenta (LALLI et al., 1997; SLACK et al., 1997; FUJII et al., 1989).

O PLB não foi identificado na musculatura esquelética de contração rápida (SIMMERMAN & JONES, 1998), porém, a sua expressão pode ser induzida neste músculo por estimulação de baixa frequência (BRIGGS et al., 1990; LEBERER et al., 1989), a qual induz a mudança do fenótipo do músculo de contração rápida para o de contração lenta. Sob estas condições, a isoforma da Ca^{2+} -ATPase (SERCA1a) do músculo esquelético é alterada para a isoforma encontrada no músculo esquelético de contração lenta e no tecido cardíaco (SERCA2a) (BRIGGS et al., 1990; LEBERER et al., 1989).

O PLB possui 52 aminoácidos e, no seu estado não fosforilado, é um inibidor da SERCA, sendo tal inibição revertida quando o PLB é fosforilado. O PLB encontra-se organizado em três domínios: o domínio citosólico Ia (aminoácidos de 1 a 20), onde está a serina-16, que é o sítio de fosforilação da proteína quinase A (PKA), e treonina-17, o sítio de fosforilação pela Ca^{2+} /Calmodulina (CAMK). O domínio Ib (aminoácidos de 21 a 30) que é rico em aminoácidos amidados e o domínio II (aminoácidos de 31 a 52), que atravessa a membrana celular (MACLENNAN & KRANIAS, 2003). Portanto, no miocárdio intacto, a estimulação adrenérgica resulta somente na fosforilação da serina-16 e da treonina-17 (BÖHM et al., 1994).

Uma grande região hidrofóbica e o domínio resistente à protease em cada subunidade parecem ser responsáveis pela ancoragem do PLB na membrana do retículo sarcoplasmático. Já um domínio menor, sensível à protease em cada subunidade, contém todos os locais de fosforilação (Figura 8) (SIMMERMAN & JONES, 1998).

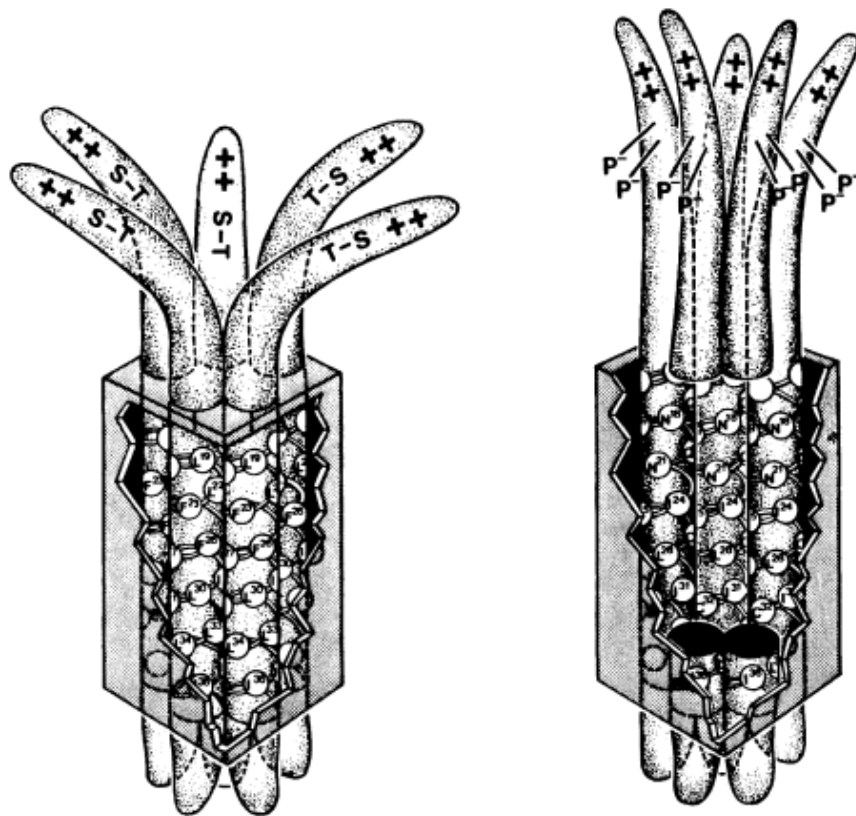


Figura 8. Modelo estrutural da proteína fosfolambam (PLB) desfosforilada (esquerda) e fosforilada (direita) com dois fosfatos (P^-) incorporados por monômero (Adaptada de SIMMERMAN & JONES, 1998).

Outro importante componente do acoplamento E-C cardíaco é o trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX), uma proteína antiporter de membrana que é expressa em quase todas as células animais. O NCX é um sistema de contra-transporte reversível com estequiometria de 3 Na^+ para 1 Ca^{2+} que produz uma corrente iônica ($I_{Na/Ca}$).

O NCX opera em paralelo com os canais de Ca^{2+} e a Ca^{2+} -ATPase sarcolemais e pode mover Ca^{2+} tanto para fora quanto para dentro da célula, dependendo da força motriz eletroquímica líquida (i.e., os gradientes de concentração de Na^+ e Ca^{2+} e o potencial de membrana) exercida sobre ele. Essa força motriz, e conseqüentemente o movimento líquido de Ca^{2+} mediado pelo NCX, pode mudar de direção durante o ciclo de atividade da célula, quando o potencial de membrana varia (ex.: durante o potencial de ação) e/ou quando as concentrações citosólicas de Na^+ ($[Na^+]_i$) ou de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) são alteradas (BLAUSTEIN & LEDERER, 1999).

Simplificadamente, altas concentrações de Ca^{2+} citosólico favorecem seu efluxo (modo normal), enquanto potenciais de membrana positivos e altas

concentrações de Na^+ intracelular favorecem o influxo de Ca^{2+} (modo reverso) (BERS, 2002).

Segundo Nicoll et al. (1990) o NCX é composto por 970 aminoácidos e tem uma massa molecular estimada em 108 kDa.

O NCX compreende uma família de três genes que codifica três proteínas: NCX1 (ARLOCK & KATZUNG, 1985), NCX2 (BLAUSTEIN, 1974) e NCX3 (NICOLL et al., 1996). Estes genes possuem um padrão similar de hidropatia, sugerindo estruturas similares. O NCX1 é amplamente distribuído em células e tecidos (incluindo o tecido cardíaco, musculatura esquelética e lisa), neurônios, astrócitos, rins, pulmões e baço (QUEDNAU et al., 1997). Em contraste, o NCX2 e o NCX3 são encontrados no cérebro e na musculatura esquelética (LI et al., 1994; NICOLL et al., 1996).

A fase de leitura aberta (do inglês “open reading frame”) do NCX1 pode sofrer splicing alternativo para produzir as diversas isoformas que são encontrados em vários tecidos (SCHULZE ET AL., 1996). O gene do NCX1 possui 6 éxons, sendo que um par exclusivo (chamado de A ou B) combina com quatro éxons cassetes (chamados de C, D, E, e F) e são organizados para produzir até 32 isoformas distintas. A principal região do splicing alternativo na fase de leitura aberta é encontrada numa alça (*loop*) da proteína (Figura 9).

Após o códon de parada, há regiões com sequências conservadas entre as isoformas (KRAEV et al., 1996). O sequenciamento do DNA complementar (cDNA) do NCX1 canino, por exemplo, é composto por uma sequência de 2.910 nucleotídeos. O porquê da existência dessas diferentes isoformas ainda permanece sem respostas.

Apesar da magnitude do influxo de Ca^{2+} através dos canais L da sarcolema ser variável nas diferentes espécies de mamíferos, a maioria dos estudos indica que este é insuficiente para suportar a contração exigida pelo nível de atividade nos mamíferos (BERS, 1991; CHAPMAN, 1983). Assim, o Ca^{2+} liberado pelo RS constitui-se na principal fonte deste íon para a contração no coração de todos os mamíferos já estudados (WIER, 1990).

Por outro lado, no coração dos vertebrados inferiores a situação parece ser diferente. Tibbits et al. (1991) sugeriram que no miocárdio de anfíbios, o Ca^{2+} liberado pelo RS não é significativo para a contração, além de ter sido contestada a ocorrência do mecanismo denominado liberação de cálcio induzida pelo cálcio (CICR) no ventrículo destes animais (FABIATO, 1983). A contração ventricular em

anfíbios parece ser relativamente insensível à rianodina (um alcaloide capaz de impedir o acúmulo de Ca^{2+} no interior do retículo sarcoplasmático), mesmo em concentrações que comprovadamente neutralizam a atividade deste canal, quando os experimentos são conduzidos utilizando-se frequências estimulatórias e temperaturas fisiológicas (BERS, 1985).

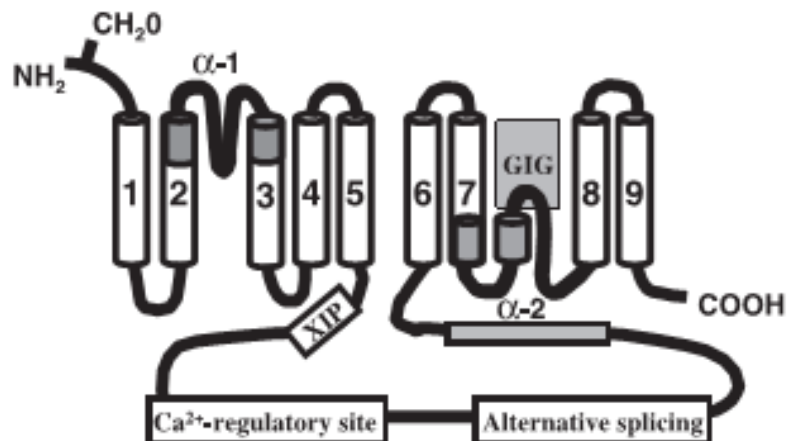


Figura 9. Modelo estrutural da proteína NCX mostrando os nove segmentos transmembrana (Adaptada de DIPOLO & BEAUGÉ, 2006).

Tibbits et al. (1992a) enfatizam que, em anfíbios, a importância relativa do fluxo de Ca^{2+} através da SL pode também ser indicada por um potencial de ação (P.A.) mais duradouro, resultante de uma fase platô mais pronunciada (723 ± 106 ms à temperatura ambiente), o mesmo ocorrendo na maioria dos peixes investigados até o momento (e.g. 556 ± 56 ms a 20°C em carpa cruciana, *Carassius carassius*, VORNANEN, 1989). Isso contrasta com os resultados obtidos para os mamíferos, nos quais até mesmo nas espécies que apresentam um P.A. de duração relativamente longa, esse tempo não chega a atingir a metade do valor observado nos anfíbios (e.g. 372 ± 14 ms a 23°C em coelhos).

Segundo Driedzic & Gesser (1994), um P.A. mais duradouro resulta na manutenção de um potencial de membrana positivo e, conseqüentemente, na maior permanência dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes no estado aberto, além de favorecer o influxo de Ca^{2+} através do NCX no seu modo reverso (TIBBITS et al., 1992b). Isso sugere que a duração e a amplitude da contração sejam fortemente

determinadas pela despolarização da membrana nos ventrículos de vertebrados inferiores.

O RS corresponde a aproximadamente 0,5% do volume do miócito de peixes e anfíbios, diferindo dos cerca de 7,3% observados em ratos (HELLE, 1983; LEKNES, 1984). Infelizmente, há poucos dados na literatura sobre a morfologia dos miócitos cardíacos de répteis, bem como sobre o manejo de Ca^{2+} e a contratilidade miocárdica deste grupo de vertebrados.

Na serpente “western garter”, *Thamnophis elegans*, Leeson (1981) encontrou miócitos de pequeno diâmetro (8 a 12 μm – poucos miócitos ventriculares com 14 μm), poucas miofibrilas por célula, ausência de túbulos T, RS pobremente desenvolvido, normalmente sob a forma de vesículas dilatadas e em algumas células, ausentes. Tais achados sugerem que essa organela não seja funcional nestes animais.

No miocárdio de jibóia, *Boa constrictor*, Leak (1967) descreveu pequenas vesículas dispersas no sarcoplasma, mas não encontrou um RS complexo ao redor das miofibrilas. Células miocárdicas bastante complexas foram descritas para o lagarto *Anolis sp* (FORBES & SPERELAKIS, 1971).

Enquanto o RS das serpentes já estudadas apresenta-se na forma de elementos vesiculares, o lagarto *Anolis sp* apresenta RS formado por uma rede de túbulos bem desenvolvidos e interconectados (LESSON, 1981; BOSSEN & SOMMER, 1984), muito similares àqueles encontrados para galináceos e mamíferos, não sendo, contudo, tão extensos. No entanto, Leak (1967) observou que iguanas da mesma família que o *Anolis* (Iguanidae), não apresentam tal sistema reticular.

Okita (1971) estudou a tartaruga do gênero *Amyda* e descreveu miócitos cardíacos de pequeno diâmetro (13 μm), túbulos T curtos no nível da linha Z (similar a mamíferos), RS bem desenvolvido circundando as miofibrilas e, ainda, RS associado com os túbulos T e próximo à sarcolema, sugerindo que, neste gênero, os mecanismos do acoplamento E-C não diferem dos apresentados por mamíferos. Entretanto, não há estudos sobre a contratilidade cardíaca deste gênero de tartaruga.

Galli et al. (2006), estudando a tartaruga da espécie *Trachemys scripta*, encontraram miócitos cardíacos com grande relação superfície-volume, o que aumentaria a eficiência do transporte de Ca^{2+} , reduzindo distâncias de difusão da superfície até os miofilamentos. Segundo esses autores, o RS desempenha

pequeno papel na ciclagem de Ca^{2+} sendo que os canais do tipo L são a fonte predominante de Ca^{2+} (5x o valor encontrado para mamíferos adultos e ~2x o valor encontrado para peixes) nessa espécie. Adicionalmente, esses autores sugerem que o NCX pode fornecer o Ca^{2+} ativador para contração e é capaz de manter a contração do miócito independentemente do RS e dos canais L.

1.4. Ação dinâmica específica (SDA)

O aumento da taxa metabólica gerada a partir dos processos mecânicos e fisiológicos da digestão é conhecido como "ação dinâmica específica" ("specific dynamic action" - SDA) e representa o custo energético do processamento, digestão e absorção dos alimentos (SECOR et al. 2000).

A SDA já foi estudada e quantificada em mais de 250 espécies entre invertebrados e vertebrados. O tipo de alimento, a sua massa e composição, a sua temperatura, assim como o tamanho e a composição corporal do animal, como também vários fatores ambientais, como por exemplo, a temperatura ambiente e a concentração gasosa, podem ter um impacto significativo na magnitude e na duração da resposta da SDA (ANDRADE et al. 1997; SECOR, 2009).

Por exemplo, refeições grandes, intactas ou que possuem um exoesqueleto duro, requerem um maior esforço digestivo e, desse modo, geram uma maior SDA enquanto refeições pequenas, fragmentadas e mais moles ou macias, geram uma menor SDA. Diferenças nas fases de deglutição, quebra do alimento e absorção intestinal, como também nas fases de catabolismo e síntese influenciam diretamente a SDA, podendo gerar variações (SECOR, 2009).

A resposta da digestão pode elevar consideravelmente o metabolismo geral de um animal a valores extremos, muitas vezes superiores aos observados em atividade (HICKS & BENNETT, 2004). O pico metabólico da SDA pode, de forma geral, elevar a taxa metabólica em até 50% em humanos, 320% na maioria dos demais animais e de até 1600% nas serpentes com forrageamento do tipo "senta e espera" (JANES & CHAPPELL, 1995; SECOR & DIAMOND, 1995).

Alguns répteis Squamata possuem a capacidade de ingestão de grandes presas. Esta característica é notável em alguns grupos de serpentes que podem ingerir até o equivalente a 100% de sua massa corpórea. Experimentos com a píton (*Python molurus*) demonstraram um aumento de até 44 vezes na taxa metabólica de

repouso nos animais alimentados com o equivalente a 100% de sua massa corpórea (SECOR & DIAMOND, 1997a).

Em *P. molurus*, durante a digestão, um processo de hipertrofia fisiológica pode ser observado em órgãos como fígado, rins, pâncreas, intestino, pulmões e estômago (SECOR & DIAMOND, 1997b). As causas desse processo ainda são pouco conhecidas e podem ser decorrentes do aumento na síntese proteica ou um aumento na concentração de fluidos (SECOR & DIAMOND, 1998; STARCK & BEESE, 2001). Além destes órgãos, Andersen et al. (2005) constataram que em *Python molurus* analisadas durante o pico da SDA (48 horas após a ingestão do alimento), ocorre um aumento de 40% na massa muscular ventricular e que essa hipertrofia é naturalmente revertida ao final do processo de Digestão.

Segundo Andersen et al. (2005), a hipertrofia ventricular em *Python molurus* deve, provavelmente, melhorar o transporte de oxigênio visando suprir a demanda metabólica alterada pela digestão e poderia explicar a tendência de aumento de até 50% no volume de ejeção sistólico observado nesses animais por Secor et al. (2000).

1.5. Metabolismo de répteis e implicações na fisiologia cardíaca

Muitos sauropsídeos ectotérmicos mostram respostas rápidas e totalmente reversíveis após a alimentação. Pouco tempo após a alimentação, a taxa metabólica, as enzimas digestivas e diferentes órgãos como o fígado, rim, pâncreas, intestinos, pulmões e estômago, são aumentados. Padrões pós-prandiais foram estudados principalmente em serpentes e anuros (SECOR et al., 1994; SECOR & DIAMOND, 1995, 1997a,b; SECOR et al., 1998; JACKSON & PERRY, 2000; SECOR, 2001; STARCK & BEESE, 2001; 2002; OVERGAARD et al., 2002; CRAMP et al., 2005; CRAMP & FRANKLIN, 2005; LIGNOT et al., 2005; STARCK, 2005; STARCK e WIMMER, 2005; STARCK et al., 2007; SECOR, 2008).

Aumentos nos gastos de energia são acompanhados por incrementos tanto na ventilação quanto débito cardíaco para a manutenção das trocas gasosas em níveis adequados. Estas respostas são geralmente maximizadas durante períodos de atividade locomotora extenuante e outras atividades que envolvam a contração vigorosa dos músculos esqueléticos (BRETT, 1972; SEEHERMAN et al., 1981; TAIGEN & WELLS, 1985; WALTON et al., 1990; SUAREZ, 1992). Em tais casos de

esforço físico extremo, o débito cardíaco é em grande parte dedicado ao músculo esquelético, a fim de sustentar o metabolismo aeróbio. Em contraste, tem sido demonstrado que a píton (*Python molurus*) não atinge taxas máximas de consumo de oxigênio durante o exercício extenuante, mas sim, durante a digestão (SECOR & DIAMOND, 1995, 1997a,b).

Nas pítons, a SDA pode estimular um aumento no consumo de oxigênio de até de 44 vezes, um aumento que ultrapassa de longe o incremento de 7 a 10 vezes que experimentam durante contrações locomotoras vigorosas (SECOR & DIAMOND, 1995) ou durante as rápidas contrações de sua musculatura axial para gerar calor durante a incubação dos ovos (VINEGAR et al., 1970).

Em diversas espécies de répteis já estudadas, a alimentação gera um rápido aumento das taxas de troca gasosa, cujo pico ocorre geralmente um dia ou dois após a alimentação, antes de sofrer um declínio mais lento e retornar aos valores pré-alimentação, como mostra a figura 10.

A ampla plasticidade da fisiologia e, mais especificamente, da função cardíaca exibida pelos vertebrados basais é um grande desafio a ser desvendado em cada espécie. Tal plasticidade impõe restrições a generalizações em estudos da função cardíaca desses animais, devendo-se levar em consideração não apenas os parâmetros abióticos a que estão sujeitos, mas também as condições fisiológicas, como é o caso do estado nutricional, bem como a utilização de diferentes técnicas que possam cobrir maior espectro de aspectos relevantes aos mecanismos relacionados à sua fisiologia cardíaca.

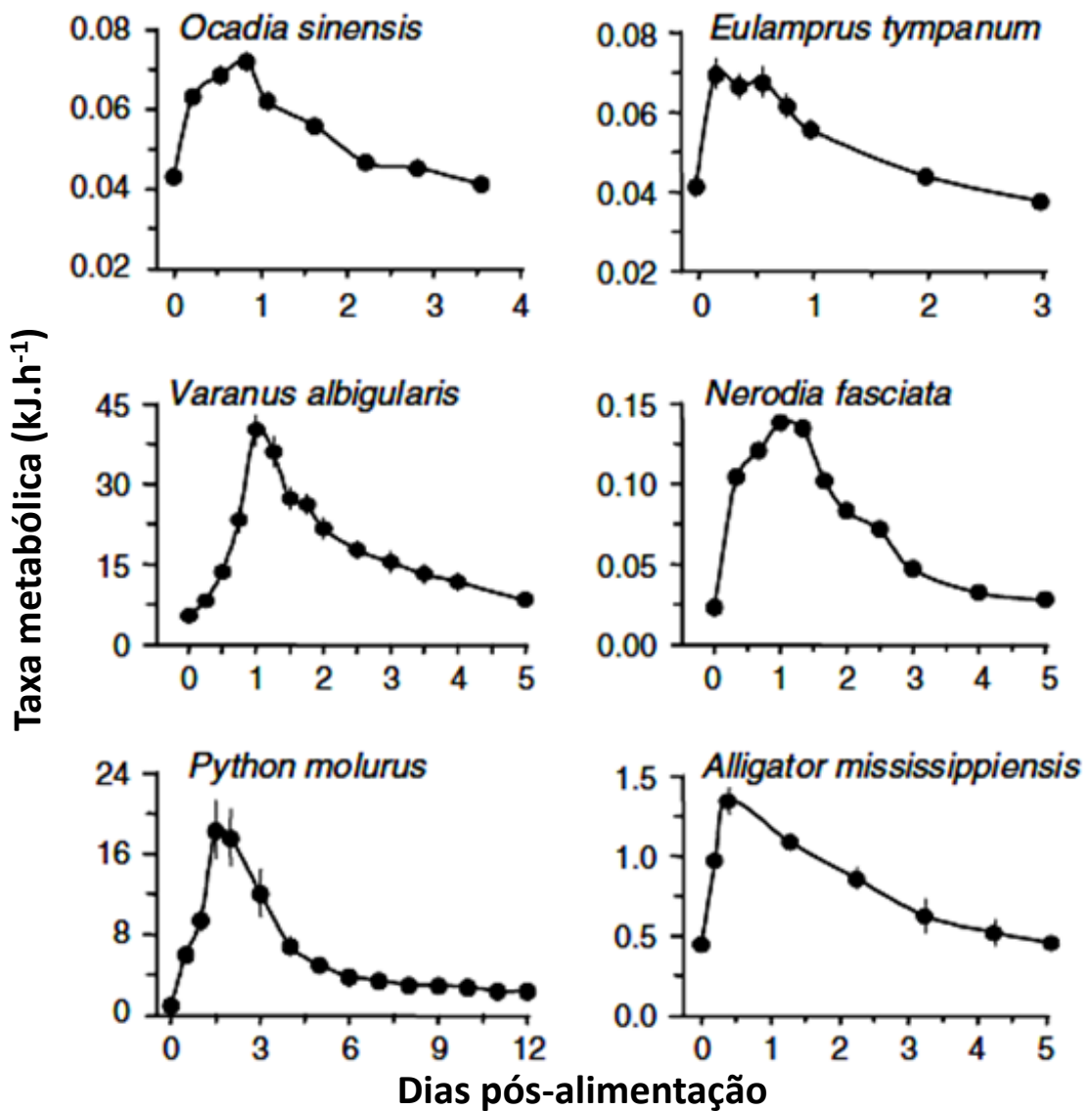


Figura 10. Perfis metabólicos pós-prandiais de seis espécies de répteis. Note os aumentos de 3 a 15 vezes na taxa metabólica em 1 ou 2 dias após a alimentação. (Adaptada de SECOR, 2009)

Para resistir a extremos metabólicos como os descritos acima, o coração deve permanecer íntegro na sua capacidade contrátil e ser capaz de se ajustar à nova demanda metabólica, portanto, é possível que haja mudanças na expressão de proteínas cardíacas, acompanhando desse modo os ajustes necessários. Diante de tudo o que foi exposto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a expressão de três proteínas cardíacas responsáveis pela dinâmica do cálcio intracelular com relação ao regime alimentar das espécies em estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Visto que pouco se sabe sobre a fisiologia cardíaca de répteis, o presente trabalho teve como objetivos gerais a análise da expressão das proteínas Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2), da fosfolambam (PLB) e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) de 3 espécies de répteis: jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), da cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*) e da píton (*Python molurus*). Os estudos foram realizados com animais durante diferentes períodos nutricionais (jejum, digestão e pós-absortivo) para a investigação de possíveis efeitos na expressão destas proteínas. A validade dos estudos por Western Blotting foi investigada pela homologia entre as proteínas.

2.2 Específicos

- Investigar a validade do estudo da expressão de proteínas por Western blotting utilizando anticorpos desenvolvidos para mamíferos em organismos filogeneticamente distantes como os répteis;
- Verificar a presença das proteínas SERCA2, PLB e NCX nas espécies em estudo;
- Identificar possíveis mudanças na expressão das proteínas SERCA2, PLB e NCX em função do regime alimentar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Os animais

Os espécimes de jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*) e píton (*Python molurus*) utilizados no presente estudo foram cedidos pelo laboratório Jacarezário do Departamento de Zoologia da UNESP, campus Rio Claro, SP.

3.1.1. A píton (*Python molurus*)

Nativas de florestas tropicais e pântanos do sudeste da Ásia, as pítons estão entre as maiores serpentes do mundo. Podem atingir 7 metros ou mais de comprimento e, em média, podem ter até 90 kg de peso corpóreo (Figura 11).

Quando jovens, passam a maior parte do tempo nas árvores. Contudo, quando atingem o tamanho adulto, a subida em árvores torna-se dificultosa e passam a habitar o chão. Também são excelentes nadadoras e podem submergir por até 30 minutos sem subir à superfície para respirar.



Figura 11. Exemplar de píton, *Python molurus*, utilizada no presente estudo (CIPRIANO, 2012).

São predadoras podendo alimentar-se, na natureza, de grandes presas intactas em intervalos relativamente pouco frequentes (SECOR, 2003).

Tem pequena acuidade visual, usam primariamente os quimiorreceptores da língua e termorreceptores ao redor da mandíbula para localizar suas presas. A morte das presas se dá por constrição, prendendo-as com seus dentes afiados, enrolando-se ao redor de seus corpos e espremendo-as até a morte por sufocação. Possuem ligamentos elásticos na mandíbula que as permite engolir a presa inteira (POUGH et al., 2008).

A píton ocupa a seguinte posição sistemática:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Reptilia

Ordem: Squamata

Família: Boidae

Gênero: Python

Espécie: *Python molurus* (LINNAEUS, 1758).

Todas as espécies de píton são ovíparas, apresentando cuidado parental, especialmente a espécie em questão, na qual a fêmea mantém a temperatura do corpo elevada para incubação do ovo. Em cada evento reprodutivo de *P. molurus* podem ser postos mais de 20 ovos (ZUG et al, 2001).

3.1.2. A cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*)

A região neotropical abriga grande parte das espécies de serpentes do mundo (UETZ, 2000), o que evidencia seu potencial para estudos herpetológicos. As serpentes pertencentes ao gênero *Crotalus*, popularmente conhecidas como cascavéis, são serpentes robustas, ágeis e de hábitos terrestres (Figura 12). Estas serpentes são facilmente identificadas por apresentarem na extremidade caudal um guizo ou chocalho (MELGAREJO, 2003). Cada anel do guizo não representa um ano de vida da cascavel e sim, uma muda de pele, que pode ocorrer várias vezes num único ano (CARDOSO et al., 2003).

No Brasil, o gênero é representado por uma única espécie, a *Crotalus durissus*, a qual apresenta uma vasta distribuição geográfica. Essas serpentes são encontradas desde os cerrados do Brasil central, até regiões áridas e semi-áridas do

Nordeste, seguindo pelo extremo Sul e Norte do país. Essa espécie subdivide-se em cinco subespécies: a *Crotalus durissus terrificus*, predominante das regiões Sudeste e Sul; a *Crotalus durissus collilineatus*, comum na região centro-oeste, se estendendo até o estado de Rondônia; a *Crotalus durissus cascavella*, a cascavel nordestina, e as menos conhecidas, tais como a *Crotalus durissus ruruima* e a *Crotalus durissus marajoensis*, são restritas às regiões das savanas do estado de Roraima e da ilha de Marajó, respectivamente (MELGAREJO, 2003).



Figura 12. Exemplar de cascavel sul-americana, *Crotalus durissus terrificus* (OTANI, 2013).

Segundo Cardoso et al. (2003), a cascavel é uma serpente terrícola, de hábitos crepusculares e noturnos, alimentando-se principalmente de pequenos mamíferos.

A cascavel ocupa a seguinte posição sistemática:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Reptilia

Ordem: Squamata

Subordem: Serpentes

Família: Viperidae

Gênero: *Crotalus*

Espécie: *Crotalus durissus* (LINNAEUS, 1758).

São serpentes cujo aparelho inoculador de veneno é extremamente eficiente, dotado de presas móveis e canaliculadas. Entre as narinas e os olhos encontra-se a fosseta loreal, órgão responsável pelas sensações térmicas, que facilitam a localização das presas e a locomoção (CARDOSO et al., 2003).

Segundo Paula (2012), as cascavéis, por serem animais típicos de regiões secas, enfrentam como desafios naturais a variação de temperatura e a disponibilidade de alimento. A alimentação de cascavéis é composta de pequenos roedores e aves, que normalmente migram durante a época de seca. Sendo predador do tipo “senta e espera”, a baixa disponibilidade de presas no ambiente somada à alta temperatura, em média 30°C, que impossibilita a redução da taxa metabólica como forma de economizar energia, tornam a cascavel uma espécie interessante para estudo do jejum prolongado. Aparentemente, estes animais são bem adaptados a essa condição visto que têm uma lenta redução da massa corpórea e mesmo após um longo período em privação de alimento, ainda possuem a capacidade de realizar atividade e de ingerir/digerir novamente.

Ainda segundo Paula (2012), cascavéis selvagens são capazes de ingerir grandes presas, de até 70% da sua massa corpórea. Em laboratório, é frequente a alimentação com presas equivalentes a 30% da massa corpórea, sendo o período de digestão variável de acordo com o tamanho da presa, durando, em média, 15 dias. Durante este período, a taxa metabólica destes animais aumenta cerca de 5 vezes o metabolismo padrão (ANDRADE et al. 1997).

Por outro lado, períodos de jejum prolongado também são enfrentados por estas serpentes durante a época de estiagem em ambientes como o cerrado e a caatinga, quando roedores e aves migram para outros ambientes, dificultando a obtenção de alimento. Assim, ajustes fisiológicos que a permitam a sobrevivência até que o alimento esteja novamente disponível devem estar presentes (PAULA, 2012).

3.1.3. O jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*)

O jacaré-de-papo-amarelo, *Caiman latirostris*, é um crocodiliano sul americano de porte médio, o comprimento total máximo alcançado é de 3,5 m, mas na natureza são raros os animais maiores que 2,0 m (VERDADE, 1998). O focinho é mais largo que em outros crocodilianos. O corpo é de cor verde escura, com manchas mais escuras na cabeça e pescoço (Figura 13).

Sua distribuição geográfica é restrita à América do Sul, incluindo o norte da Argentina; Brasil (estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e nas bacias hidrográficas dos Rios Paraná e São Francisco); nordeste do Uruguai, sudeste da Bolívia e sul do Paraguai (VERDADE & PIÑA, 2006). Lagoas marginais e várzeas de rios das regiões Sul, Sudeste e parte do Nordeste do Brasil são os habitats naturais de *C. latirostris* (BRAZAITIS et al., 1990).

Atualmente, o táxon não se enquadra na categoria ameaçada de extinção biológica pelo IBAMA, mas ainda está listado no Apêndice I da CITES (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), exceção feita à população da Argentina que mudou para o Apêndice II em 1997. As principais causas do declínio de suas populações são a destruição sistemática de seu habitat e a caça ilegal. A pele do *C. latirostris* é entre as do gênero *Caiman*, a mais valorizada, por apresentar produtos manufaturados de melhor qualidade (KING & BRAZAITIS, 1971; BRAZAITIS et al., 1998), apesar de não ser considerada como pele clássica (VERDADE, 1997).



Figura 13. Exemplares de jacaré-de-papo-amarelo, *Caiman latirostris* (LEITE, 2009).

O jacaré-de-papo-amarelo ocupa a seguinte posição sistemática:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Reptilia

Ordem: Crocodylia

Família: Alligatoridae

Gênero: Caiman

Espécie: *Caiman latirostris* (DAUDIN, 1802).

Os crocodilianos são predadores, podendo se alimentar de qualquer animal vivo capturável, incluindo os da mesma espécie (Santos et al., 1993). Na natureza os filhotes de crocodilianos alimentam-se de crustáceos, gastrópodes e principalmente insetos, enquanto os adultos são oportunistas e consomem mamíferos, artrópodes, peixes, aves e répteis (MCNEASE & JOANEN 1981; POOLEY 1989; MICUCCI & WALLER 1995; DIEFENBACH 1988).

De acordo com Starck et al. (2007), *C. latirostris* costumam experimentar períodos de jejum de vários meses por causa de flutuações sazonais de disponibilidade de alimentos. Durante a estação chuvosa (janeiro a maio), eles encontram abundância de alimentos (peixes, caranguejos, caracóis, vertebrados terrestres) em rios e lagoas. Durante a estação seca (junho a dezembro), podem se enterrar na lama do fundo ou se refugiar em poças relativamente pequenas onde se aglomeram atingindo altas densidades, o que faz com que as presas desapareçam rapidamente. Muitas vezes, por não ser capaz de alcançar o rio, o jacaré fica em jejum até que a próxima estação chuvosa encha as lagoas e os peixes retornem dos rios. Desta forma, esta espécie, assim como as cascavéis, está adaptada a sobrevivência durante períodos de escassez de alimentos.

3.2. Métodos

Para a realização do presente trabalho, os tecidos cardíacos das 3 espécies estudadas foram coletados dos animais utilizados por Cipriano (2012 - pítons); Paula (2012 - cascavéis) e Lopes (2013 - jacarés) em suas dissertações de mestrado e tese de doutorado, respectivamente, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (Pareceres n° 081/2010 e n° 033/2009). As condições de manutenção em laboratório e os diferentes regimes alimentares aos quais os animais foram submetidos serão descritos a seguir.

Em laboratório, os animais foram mantidos em sala climatizada a 30 °C e fotoperíodo natural.

As serpentes foram mantidas em caixas individualizadas, com disponibilidade de água *ad libitum*. Os jacarés foram mantidos em aquaterrários (2 animais por aquaterrário), um misto de aquário e terrário com uma parte seca e outra alagada, permitindo a permanência fora ou dentro da água.

3.2.1. Regimes alimentares

Pítton

As pítons foram divididas em 2 grupos alimentares: o grupo Digestão e o grupo Pós-absortivo. As serpentes do grupo Digestão foram alimentadas com ratos Wistar adultos (cedidos pelo Biotério Central da UFSCar) com pesos equivalentes a 30% da massa corpórea da serpente e os experimentos tiveram início 2 dias após a alimentação. As serpentes do Grupo Pós-absortivo também foram alimentadas com ratos Wistar adultos com pesos equivalentes a 30% da massa corporal da serpente, porém os experimentos tiveram início 28 dias após a alimentação.

Cascavel sul-americana

As cascavéis foram divididas em três grupos alimentares: grupo Digestão, grupo Pós-absortivo e grupo Jejum.

No grupo Digestão, o animal foi alimentado regularmente (1 camundongo a cada 15 dias). A última alimentação dos animais foi realizada 34 horas antes do início dos experimentos, para que o coração fosse obtido durante o pico de Digestão (ANDRADE, 1997). Foram oferecidos ratos Wistar adultos com massa equivalente a 30% da massa corporal de cada serpente.

O grupo em Jejum foi mantido em privação total de alimento. Previamente, os animais desse grupo foram inicialmente pesados e alimentados para garantir a mesma condição alimentar para todos antes do experimento. Nesse grupo, foi realizado o monitoramento da perda de massa corpórea por meio de pesagens a cada 20 dias até que fosse registrada perda de 30% da massa corpórea ou que se completasse um ano de privação alimentar. O grupo Jejum foi incluído nessa espécie devido à cascavel-sul-americana ser um predador do tipo “senta e espera”, a baixa disponibilidade de presas no ambiente somada à alta temperatura, em média 30 °C impossibilita a redução da taxa metabólica como forma de economizar energia. Estes animais são bem adaptados a essa condição visto que têm uma lenta

redução da massa corpórea e mesmo após um longo período em privação de alimento, ainda possuem a capacidade de realizar atividade e de ingerir/digerir novamente. Estas características tornam a cascavel uma espécie interessante para estudo do jejum prolongado (Paula, 2012).

No grupo Pós-absortivo a alimentação consistiu de ratos com peso equivalente a 30% da massa corporal da serpente. A última alimentação de cada animal utilizado ocorreu cerca de 30 dias antes da experimentação.

Jacaré-de-papo-amarelo

Os jacarés foram divididos em dois grupos alimentares: grupo Digestão e grupo Pós-absortivo. Os animais foram alimentados com miúdos e pescoços de frango (peso equivalente a 15% do peso do animal). No grupo digestão, a alimentação foi interrompida dois dias antes do experimento. Já os animais do grupo Pós-absortivo tiveram a alimentação interrompida por 30 dias antes do início dos experimentos.

3.2.2. Sacrifício e coleta de tecidos

Os animais foram sacrificados por decapitação e, logo após, amostras do ventrículo e do átrio foram congeladas em nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196 °C, e em seguida foram estocadas em ultrafreezer à -80 °C.

3.2.3. Western blotting

Para expressão das proteínas Ca^{2+} ATPase (SERCA2), fosfolambam (PLB) e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) utilizou-se a técnica Western Blotting.

A técnica Western Blotting foi desenvolvida no laboratório do Prof. George Stark na Universidade de Stanford (BURNETTE et al., 1981). O nome Western Blotting foi dado por W. Neal Burnette e é um trocadilho para o nome Southern Blotting, técnica para detecção de DNA desenvolvida anteriormente por Edwin Southern (SOUTHERN, 1975) Também há uma técnica chamada Northern blotting que é utilizada para a detecção de RNA (ALWINE et al., 1977).

O Western Blotting consiste na identificação de uma determinada proteína numa mistura contendo várias outras proteínas, baseada no reconhecimento de

natigênicos específicos da mesma por anticorpos monoclonais (derivado de um clone de células de hibridoma que reconhece somente um sítio antigênico) ou policlonais (originado de múltiplas linhagens de produtores de anticorpos, sendo menos homogêneos e específicos, mas que reconhecem uma gama de antígenos maior do que os anticorpos monoclonais).

Para tal, utiliza-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), onde o detergente aniônico dodecil-sulfato de sódio (SDS) confere carga negativa às proteínas, facilitando a separação por massa molecular decorrente da aplicação de um campo elétrico. As proteínas são transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose ou de fluoreto de polivinilideno - PVDF), onde serão utilizadas como sonda para anticorpos específicos à proteína a ser estudada.

3.2.4. Homogeneização do músculo cardíaco

Os ventrículos e átrios congelados (-80 °C) de *Caiman latirostris*, *Crotalus durissus terrificus*, *Python molurus* e o ventrículo esquerdo do rato Wistar (*Rattus norvegicus*), foram pesados para serem homogeneizados. O tecido cardíaco do rato Wistar foi utilizado como controle positivo.

Para homogeneização procurou-se respeitar uma relação de 1 mg de tecido para 1 µL de tampão. Para a elaboração do homogenato dos répteis, utilizou-se aproximadamente 500 mg de tecido em 500 µL de tampão. Foi necessário utilizar um pool de tecido de cada uma das espécies em questão para atingir as proporções de massa por volume de tampão desejado. Para o homogenato do rato foi utilizado cerca de 400 mg de tecido. Para obter a fração microsomal das amostras foi utilizado o tampão hiperosmótico (sacarose 250 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM pH 7,4).

Os ventrículos e os átrios dos répteis e o ventrículo esquerdo do rato Wistar foram seccionados em pequenos fragmentos e inseridos gradativamente no tubo para homogeneização. Foi utilizado tampão gelado e o tubo contendo a amostra foi mantido no gelo durante todo o procedimento. O homogenato dos tecidos foi obtido com a utilização do homogeneizador IKA (T 10 basic ULTRA-TURRAX®), para ruptura do tecido por corte com lâminas e cavitação, sendo mantido no gelo durante todo o procedimento.

O homogenato obtido foi vertido em microtubos para centrifugação a uma força de 10.000 G por 40 min a 4 °C, para remover células intactas, fragmentos celulares e frações ricas em partículas de origem nuclear, citoesquelética e mitocondrial (NECKÁR et al., 2005). Em seguida, o sobrenadante foi colhido e o precipitado descartado.

Nas amostras utilizadas para obtenção da fração microssomal, o sobrenadante foi levado a ultracentrifugação com força de 100.000 G a 4 °C por 60 min. Após a ultracentrifugação o sobrenadante, que representa a fração citosólica, foi descartado. As vesículas microssomais, que constituem a fração com maior densidade (após a separação prévia), encontraram-se no precipitado na forma de uma densa massa ao fundo do tubo, denominado pellet. Os pellets de cada tubo foram ressuspensos em um volume reduzido (100 a 150 µL) de tampão Tris-EDTA (Tris 50 mM; EDTA 1 mM; pH 7,4).

3.2.5. Quantificação de proteína

A quantificação de proteínas foi realizada baseada no método de Bradford (1976), utilizando o kit para medida de proteínas (Bio-Rad®). Esse método envolve adição de um corante ácido a uma solução de proteínas e a subsequente medida da intensidade de reação na amostra com um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 595 nm. Cada amostra foi diluída em tampão Tris-EDTA na proporção de 1:30 (1 µL amostra e 29 µL tampão Tris-EDTA). Foram utilizados 10 µL da amostra diluída em cada poço da placa de Elisa e a esse volume acrescentou-se 200 µL do reagente de Bradford.

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando-se a placa Elisa e uma escala gradual de concentrações de proteína, para construção de uma curva padrão, utilizada como referência para a quantificação das amostras. Para esta curva de proteínas foi utilizada uma solução de albumina do soro bovino (BSA - bovine serum albumin), na concentração conhecida de 1mg.mL⁻¹. A BSA foi adicionada em quantidades crescentes nos poços da placa Elisa (0, 2, 4, 6, 8 e 10 µL), sendo completados para 10 µL com tampão Tris-EDTA. A cada poço foi acrescentado 200 µL do reagente de Bradford para reação com as proteínas e posterior leitura no espectrofotômetro.

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

3.2.6. Eletroforese

Após a quantificação de proteínas das amostras, foi determinado o volume a ser depositado em cada poço do gel de acordo com a quantidade de proteína desejada em cada corrida. A cada poço foi adicionado, além da amostra, igual volume de tampão de Laemmli (Sigma[®]).

Para a análise da expressão das proteínas SERCA2, PLB e NCX foi utilizado volume correspondente a 100 µg de proteína. Devido aos anticorpos utilizados no presente trabalho serem específicos para mamíferos, tornou-se necessária a utilização de uma concentração elevada de proteínas (RIVAROLI, 2011). Para a análise da expressão proteica do *R. norvegicus* foi utilizado uma concentração de 25 µg. Valor esse já definido em outros trabalhos (BOCALINI et al., 2012; RIVAROLI, 2011).

A um dos poços foi adicionado o marcador de massa molecular (Precision Plus Protein Prestained Standards, Dual Color – Bio-Rad[®]), resultando em bandas de diferentes massas moleculares (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 e 250 kDa) coradas para o referencial da corrida das amostras. Para as amostras que não ficaram alinhadas com as bandas do marcador foi realizado o cálculo da mobilidade relativa.

Para a confecção do gel stacking, foram utilizados pentes para 10 poços, com espessura de 1,5 mm, permitindo a utilização de amostras com volume de até 20 µL (volume da amostra + volume do tampão de Laemmli).

Para a elaboração do gel Resolving levou-se em conta a massa molecular da proteína a ser analisada, que deve atravessar a malha do gel enquanto migra ao longo do gradiente elétrico, portanto, existe uma relação definida entre a concentração de acrilamida e a faixa de separação das proteínas em kDa (WALKER & RAPLEY, 1999).

Para a proteína SERCA2 e para o NCX foi confeccionado um gel de 7,5% de poliacrilamida, e para o PLB foi utilizado um gel de 12% de poliacrilamida (Tabela 1).

O gel foi depositado entre as lâminas de vidro do kit Mini-Protean (Bio-Rad), com cuidado para não formar bolhas, e deixado para polimerizar por 30 minutos.

Após a polimerização do Gel Resolving, foi preparado o Gel Stacking, onde se encontram os poços para deposição das amostras. Após a preparação do Gel Stacking (H₂O 1,4 mL; acrilamida 30% 330 µL; TEMED 2 µL; 1,0M Tris pH 6,8 250 µL; SDS 10% 20 µL; APS 10% 20 µL - quantidades indicadas para a confecção de 2 géis de 1,5 mm de espessura no sistema Mini-Protean - Bio-Rad[®]), o mesmo foi depositado entre as lâminas de vidro do Kit Mini-Protean sobre o Gel Resolving. Imediatamente após a deposição do Gel Stacking, os pentes para a formação dos poços de corrida foram inseridos.

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

Tabela 1. Composição do gel resolving de poliacrilamida com as densidades específicas para cada proteína (7,5% para NCX e SERCA2 e 12% para PLB). Quantidades referentes à confecção de 2 géis de 1,5mm de espessura no sistema Mini-Protean (Bio-Rad[®]).

Substâncias	Poliacrilamida	
	7,5%	12%
H ₂ O	4,6 mL	3,3 mL
30% acrilamida	2,7 mL	4,0 mL
1,5M Tris pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL
10% SDS	100 µL	100 µL
10% PSA	100 µL	100 µL
TEMED	6 µL	4 µL

As amostras foram descongeladas e depositadas em microtubos em volume adequado à quantidade de proteínas para corrida. A cada microtubo foi

acrescentado igual volume de Tampão de Laemmli e em seguida aquecidos a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 5 minutos e em seguida inseridas no gel Stacking com auxílio de uma pipeta.

Após inserir as amostras nos géis, o volume da cuba foi completado com o tampão de corrida. Os eletrodos foram ligados à fonte com voltagem constante de 80 volts por aproximadamente 2 horas, em temperatura ambiente. A corrida foi finalizada quando as proteínas de baixa massa molecular das amostras avaliadas, após percorrerem o gel, chegaram à sua extremidade inferior.

A cada experimento foram preparados dois géis, um deles foi fotografado para estimar a concentração de proteína utilizando-se o software ImageJ (ABRAMOFF et al., 2004). Amostras de BSA com concentrações conhecidas (1.0; 5.0; 10.0; 20.0; 30.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram utilizadas como padrão para estimar a concentração de proteína em cada banda no gel. O outro gel foi utilizado na transferência.

3.2.7. Transferência

As proteínas separadas ao longo do gel pela eletroforese vertical foram transferidas por eletroforese para membranas de fluoreto de polividileno (PVDF), com dimensões de 5,5 x 8 cm. Antes da transferência, as membranas foram ativadas por 20 segundos em metanol, sendo posteriormente lavadas com água destilada, permanecendo no tampão de transferência (Tris 3,08 g; Glicina 14,26 g; Metanol 20%; SDS 0,05%; água destilada q.s.p. 1L) por mais 20 minutos.

Os géis foram retirados da cuba de eletroforese, sendo o gel Stacking removido com cuidado e descartado. O gel Resolving, contendo as proteínas, foi inserido no “sanduíche” de transferência (Figura 14).

O “sanduíche” é montado sobre o lado cátodo (-) da placa de transferência, onde é colocada uma esponja, um papel de Whatman, o gel e a membrana de PVDF, depois outro papel de Whatman e outra esponja que entrará em contato com lado ânodo (+). O gel e a membrana de PVDF foram marcados (pique na ponta) para criar uma marca identificadora e ter a exata localização das amostras.

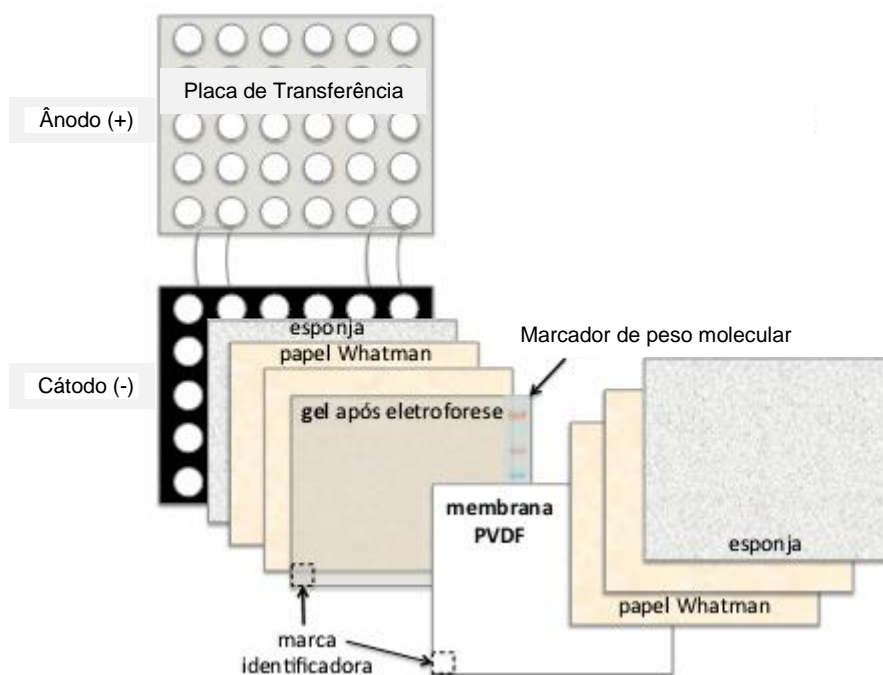


Figura 14. Esquema mostrando o “sanduíche” de transferência utilizado na cuba de eletroforese.

Na cuba de eletroforese foi colocado o sanduíche de transferência juntamente com o tampão de transferência. O sistema foi levado a geladeira a 4 °C e ligado à fonte com corrente constante de 230 miliAmpere durante 10 horas.

3.2.8. Incubação com anticorpos

Após a transferência, as membranas foram colocadas em solução bloqueadora (leite desnatado 2g e 40 mL de tampão de lavagem contendo NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; Tween-20 0,1%; H₂O destilada q.s.p. 1L) em temperatura ambiente e agitação constante por 90 minutos.

Para o estudo da expressão da SERCA2, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-SERCA (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A., Código sc-8095). O sc-8095 é um anticorpo policlonal de cabra, formado contra um peptídeo mapeado na extremidade N-terminal da proteína SERCA2 de origem humana. Para a incubação foi utilizada uma concentração 0,5 µg.mL⁻¹ de anticorpo primário em solução bloqueadora. A incubação ocorreu sob agitação constante e refrigeração (4 °C) durante toda a noite.

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

Após a lavagem, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário. Foi utilizado o anticorpo secundário anti-cabra IgG-AP (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A., Código sc-2355). O sc-2355 é procedente de camundongo, formado contra imunoglobulina G de cabra (anti-cabra) e conjugado com a fosfatase alcalina, foi utilizado em concentração de $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de solução bloqueadora. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente por 2 horas.

Para o estudo da expressão do fosfolambam, as membranas foram incubadas com o anticorpo purificado de camundongo anti-fosfolambam (clone A1) (Upstate Chemicon, U.S.A., Código #05-205). O anti-fosfolambam é um anticorpo monoclonal de camundongo formado contra o retículo sarcoplasmático bovino. Para a incubação foi utilizada uma concentração de $0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sob agitação constante e refrigeração (4°C) por toda a noite. Após a incubação do anticorpo primário, as membranas foram lavadas como descrito anteriormente.

O anticorpo secundário utilizado para a análise do fosfolambam foi de origem caprina, formado contra imunoglobulina G de camundongo conjugada com a fosfatase alcalina (Upstate Chemicon, U.S.A., Código AP308A). Para a incubação foi utilizada a concentração de $0,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em solução bloqueadora. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente por 2 horas.

Para o estudo da expressão do NCX, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-NCX1 (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A., Código sc-32881). O sc-32881 é um anticorpo policlonal de coelho, formado contra um peptídeo mapeado na extremidade C-terminal da proteína NCX1 de origem humana. Para a incubação, foi utilizada uma concentração $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de anticorpo primário em solução bloqueadora. A incubação ocorreu sob agitação constante e refrigeração (4°C) por toda a noite. Após a incubação do anticorpo primário, as membranas foram lavadas como descrito anteriormente e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário.

Para o NCX foi utilizado o anticorpo secundário anti-coelho IgG-AP (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A., Código sc-2034). O sc-2034 é procedente de cabra, formado contra imunoglobulina IgG de coelho e conjugado com a fosfatase alcalina,

utilizado em concentração de $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de solução bloqueadora. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente por 2 horas.

Todas as análises das expressões proteicas foram realizadas em duplicatas e não foi possível aplicar tratamentos estatísticos devido às pequenas quantidades de tecido cardíaco.

3.2.9. Revelação das membranas

Para identificar a expressão das proteínas na membrana foi utilizado o sistema revelador Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad®). Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem por 30 minutos, renovando o tampão de lavagem a cada 10 minutos e em seguida foram lavadas com água destilada e colocadas num recipiente fechado.

Em seguida, adicionou-se a solução reveladora e rapidamente o recipiente foi envolvido com papel alumínio para evitar o contato com a luz. Elas foram incubadas com a solução reveladora sob agitação constante por cerca de 5 minutos, tempo suficiente para detectar a luminescência correspondente ao complexo antígeno-anticorpo formados no processo. Logo após, as membranas foram lavadas novamente com água destilada e penduradas para a secagem.

3.2.10. Análise molecular

Para complementar os resultados obtidos com a técnica Western Blotting para as proteínas SERCA2, PLB e NCX, foram realizadas análises comparativas utilizando sequências de aminoácidos das proteínas estudadas em organismos pertencentes a diferentes Ordens (mamíferos, aves e peixes), obtidas em bancos públicos como o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e o UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

Os resultados dessas comparações foram obtidos após o alinhamento das sequências da SERCA2, do PLB e do NCX1 utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999) e após a comparação de sítios funcionais e domínios proteicos utilizando o site PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) (GASTEIGER et al., 2005).

4. RESULTADOS

4.1. Expressão das proteínas SERCA2, PLB e NCX

Nas três espécies de animais em estudo, foi possível detectar a expressão das proteínas SERCA2, PLB e NCX tanto no tecido cardíaco ventricular quanto no atrial, ficando dessa forma evidente a existência de semelhança entre essas proteínas com as respectivas proteínas em mamíferos, uma vez que os anticorpos que foram utilizados são específicos para mamíferos.

4.2. Expressão proteica em píton (*Python molurus*)

A figura 15 mostra a expressão das proteínas SERCA2, PLB e NCX nos dois grupos alimentares da píton. A quantificação de tais proteínas nos tecidos atrial e ventricular é mostrada na tabela 2. Houve uma diferença na expressão da SERCA2 no tecido ventricular do grupo Digestão com relação à massa molecular e a quantificação proteica (Figura 15A e D), onde o ventrículo do grupo Digestão expressou a proteína com massa molecular de 100 kDa enquanto que para o grupo Pós-absortivo, este valor foi de 104 kDa. O tecido atrial dos grupos Digestão e Pós-absortivo expressaram a proteína SERCA2 com uma massa molecular de 104 kDa.

Tabela 2. Valores da quantificação das proteínas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) nos tecidos atrial e ventricular de *P. molurus* em cada regime alimentar experimental.

Proteína	Tecido Ventricular		Tecido Atrial	
	Pós-Absortivo	Digestão	Pós-Absortivo	Digestão
SERCA2	10,5	12,6	4,3	8,6
PLB	7,6	8,8	7,1	8,4
NCX	12,9 e 3,1	17,0 e 2,0	8,4 e 2,8	10,8 e 2,4

A expressão proteica da PLB apresentou uma maior massa molecular nos dois grupos alimentares com relação ao rato. A píton expressou a proteína com massa molecular de 50 kDa, enquanto o rato expressou com 25 kDa (Figura 15B e E).

A expressão do NCX também apresentou diferença na massa molecular com relação ao rato. A análise molecular revelou a expressão de duas bandas, com 37 kDa e 39 kDa para a píton, e 40 kDa e 70 kDa para o rato (Figura 15C e F). A comparação dos grupos experimentais mostrou uma maior quantidade de proteínas no tecido ventricular do grupo Digestão, com $17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as bandas de 37 kDa e 39 kDa, respectivamente, enquanto que o grupo Pós-absortivo apresentou bandas com $12.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a banda com 37 kDa e $3.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a banda com 39 kDa (Figura 15C e F).

Para o tecido atrial, ambos os grupos alimentares expressaram bandas de 37 kDa e 39 kDa. A quantificação proteica no tecido atrial dos grupos alimentares revelou valores de $10.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $2.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ para o grupo Digestão e $8.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $2.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ para o grupo Pós-absortivo, com as bandas de 37 kDa e 39 kDa, respectivamente (Figura 15C e F).

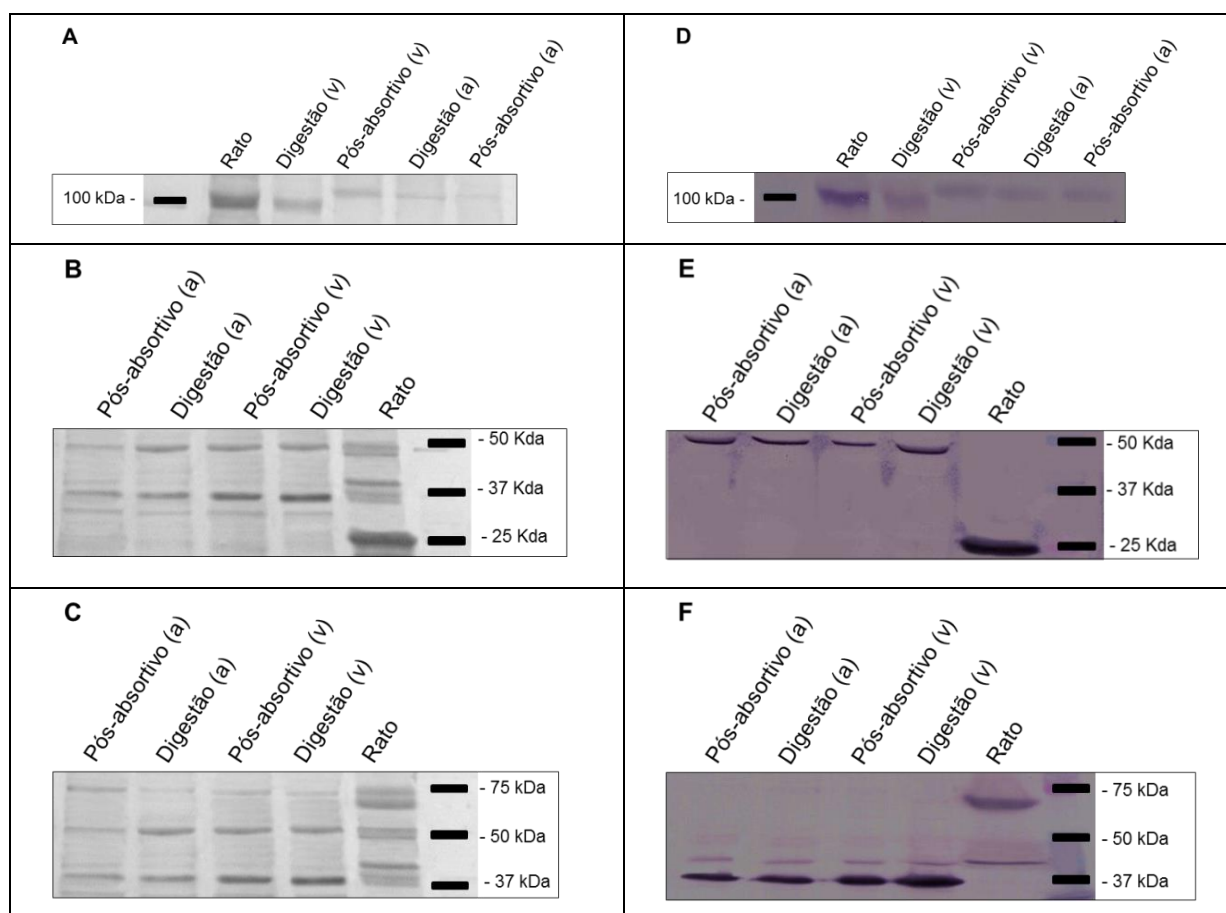


Figura 15. Análise da expressão proteica por SDS-PAGE (coluna da esquerda) da SERCA2 (Figura A), do PLB (Figura B), e do NCX (Figura C) e por Western blotting da SERCA2 (Figura D), do PLB (Figura E) e do NCX (Figura F) em ventrículo (v) e átrio (a) dos grupos alimentares Digestão e Pós-absortivo da píton (*Python molurus*) e em ventrículo esquerdo do Rato Wistar (*Rattus Norvegicus*).

4.3. Expressão proteica em cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*)

A análise da expressão das proteínas SERCA2, PLB e NCX nos tecidos ventricular e atrial dos três grupos alimentares das cascavéis é apresentada nas figuras 16 e 17, respectivamente. A quantificação da expressão destas proteínas é mostrada na tabela 3.

Os tecidos atrial e ventricular expressaram a proteína SERCA2 com a mesma massa molecular, de 100 kDa, em todos os grupos experimentais, porém, com menor quantidades de proteínas expressas nos tecidos atrial e ventricular do grupo Jejum (Figura 16A e D).

Tabela 3. Valores da quantificação das proteínas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) nos tecidos atrial e ventricular de *C. durissus terrificus* em cada regime alimentar experimental.

Proteína	Tecido Ventricular			Tecido Atrial		
	Digestão	Pós-Absortivo	Jejum	Digestão	Pós-Absortivo	Jejum
SERCA2	14,2	12,7	10,4	10,4	9,2	7,1
PLB	8,6	7,8	5,8	6,6	5,3	3,1
NCX	12,3 e 6,9	10,4 e 7,3	14,4 e 7,5	11,1 e 4,5	8,8 e 2,4	12,9 e 5,2

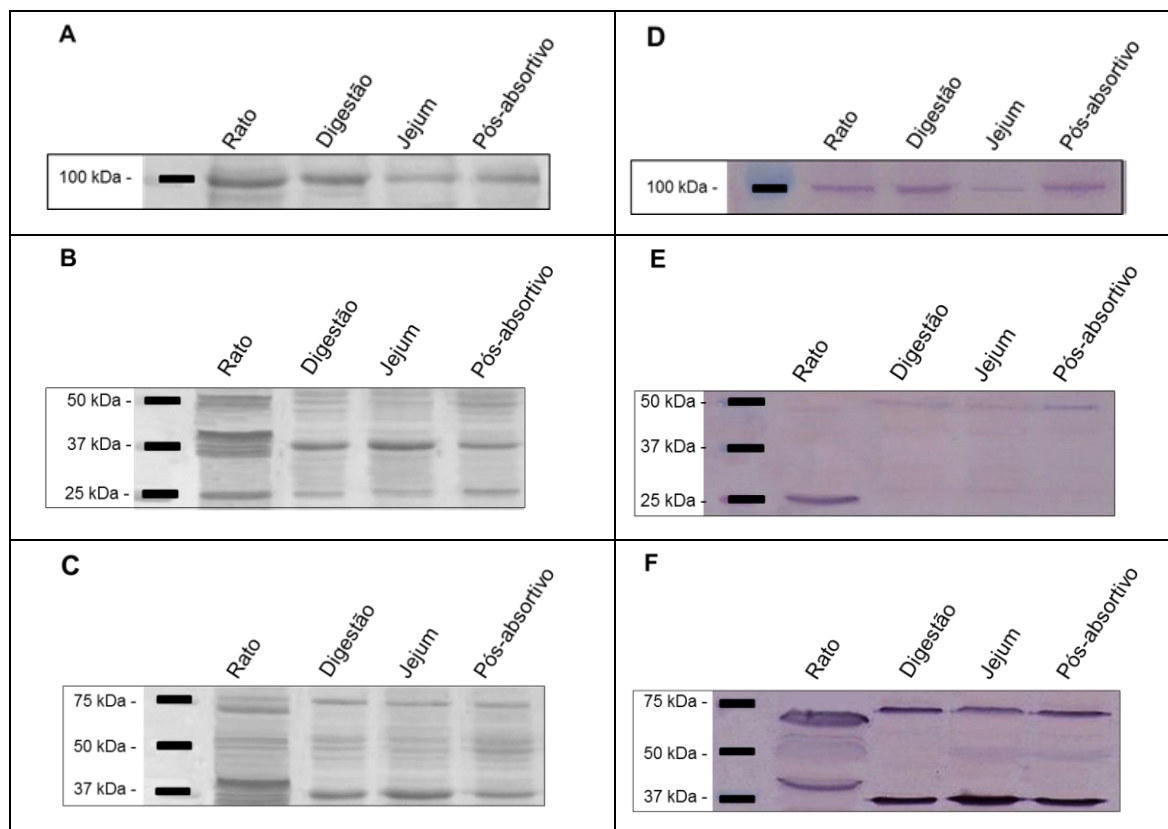


Figura 16. Análise da expressão proteica por SDS-PAGE (coluna da esquerda) da SERCA2 (Figura A), do PLB (Figura B), e do NCX (Figura C) e por Western blotting (coluna da direita) da SERCA2 (Figura D), do PLB (Figura E) e do NCX (Figura F) em ventrículo dos grupos alimentares Digestão, Jejum e Pós-absortivo da cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*) e em ventrículo esquerdo do Rato Wistar (*Rattus Norvegicus*).

A análise do PLB mostrou que os três grupos alimentares expressaram esta proteína com massa molecular de 50 kDa em ambos os tecidos, enquanto o rato Wistar expressou essa proteína com 25 kDa (Figuras 16B e E; 17B e E).

A expressão do NCX apresentou duas bandas nos três grupos alimentares em ambos os tecidos. Houve a expressão de uma banda com 75 kDa e outra com 37 kDa. O rato Wistar também expressou duas bandas, uma com 70 kDa e a outra com 40 kDa (Figura 16C e F; 17C e F). As duas bandas expressas em cada grupo alimentar apresentaram diferentes quantidades de proteínas. O tecido ventricular dos grupos Digestão, Jejum e Pós-absortivo apresentaram valores de $12.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $14.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nas bandas com massa molecular de 37 kDa, e $6.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $7.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $7.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nas bandas com 75 kDa, respectivamente (Figura 16C e F). Já o tecido atrial os grupos Digestão, Jejum e Pós-absortivo apresentaram valores de $11.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $12.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $8.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nas bandas com massa

molecular de 37 kDa, e $4.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nas bandas com 75 kDa, respectivamente (Figura 17C e F).

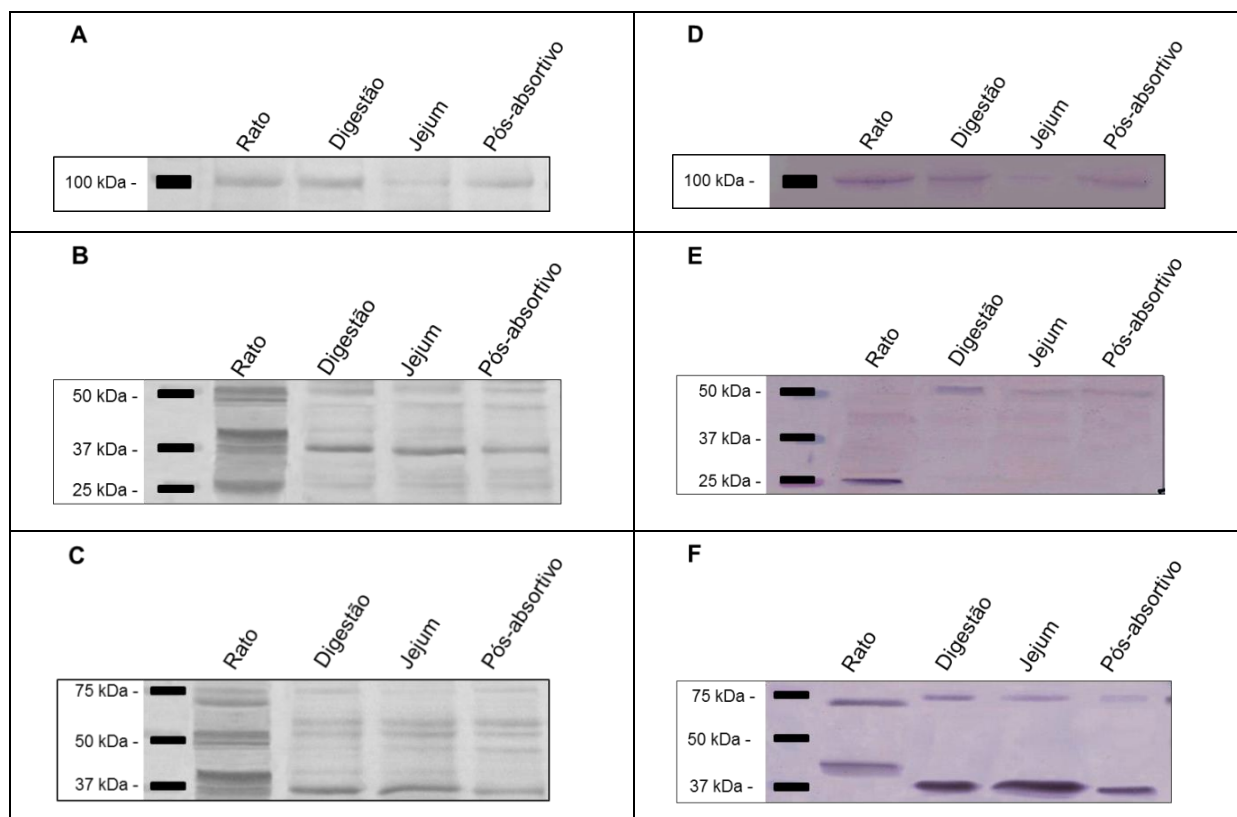


Figura 17. Análise da expressão proteica por SDS-PAGE (coluna da esquerda) da SERCA2 (Figura A), do PLB (Figura B), e do NCX (Figura C) e por Western blotting (coluna da direita) da SERCA2 (Figura D), do PLB (Figura E) e do NCX (Figura F) em átrio dos grupos alimentares Digestão, Jejum e Pós-absortivo da cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*) e em ventrículo esquerdo do Rato Wistar (*Rattus Norvegicus*).

4.4. Expressão proteica em jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*)

A figura 18 mostra a expressão das proteínas SERCA2, PLB e NCX nos dois grupos alimentares de jacarés de papo amarelo. A quantificação de tais proteínas nos tecidos atrial e ventricular é mostrada na tabela 4.

A proteína SERCA apresentou massa molecular de 100 kDa, mesmo valor expresso para o rato (Figura 18A e D)

A proteína PLB apresentou massa molecular de 50 kDa, enquanto o rato expressou esta proteína com 25 kDa (Figura 18B e E).

A expressão da proteína NCX apresentou duas bandas, com massas moleculares de 37kDa e 53 kDa, enquanto o rato expressou bandas de 40 kDa e 70 kDa (Figura 18C e F).

Houve uma maior expressão no tecido ventricular com o grupo Digestão seguido pelo grupo Pós-absortivo, onde o grupo Digestão apresentou valores de 6.9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 17.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as bandas de 37 kDa e 53 kDa, respectivamente, e o grupo Pós-absortivo apresentou 7.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 12.3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as bandas de 37 kDa e 53 kDa, respectivamente (Figura 18C e F).

No tecido atrial o grupo Digestão apresentou valores de 6.3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as bandas de 37 kDa e 58 kDa, respectivamente, e o grupo Pós-absortivo 4.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 8.4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as bandas de 37 kDa e 53 kDa, respectivamente (Figura 18C e F).

Tabela 4. Valores da quantificação das proteínas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) nos tecidos atrial e ventricular de *C. latirostris* em cada regime alimentar experimental.

Proteína	Tecido Ventricular		Tecido Atrial	
	Pós-Absortivo	Digestão	Pós-Absortivo	Digestão
SERCA2	3,5	4,2	3,0	3,0
PLB	3,1	3,5	3,4	3,8
NCX	6,9 e 17,2	7,5 e 12,3	4,8 e 8,4	6,3 e 10,6

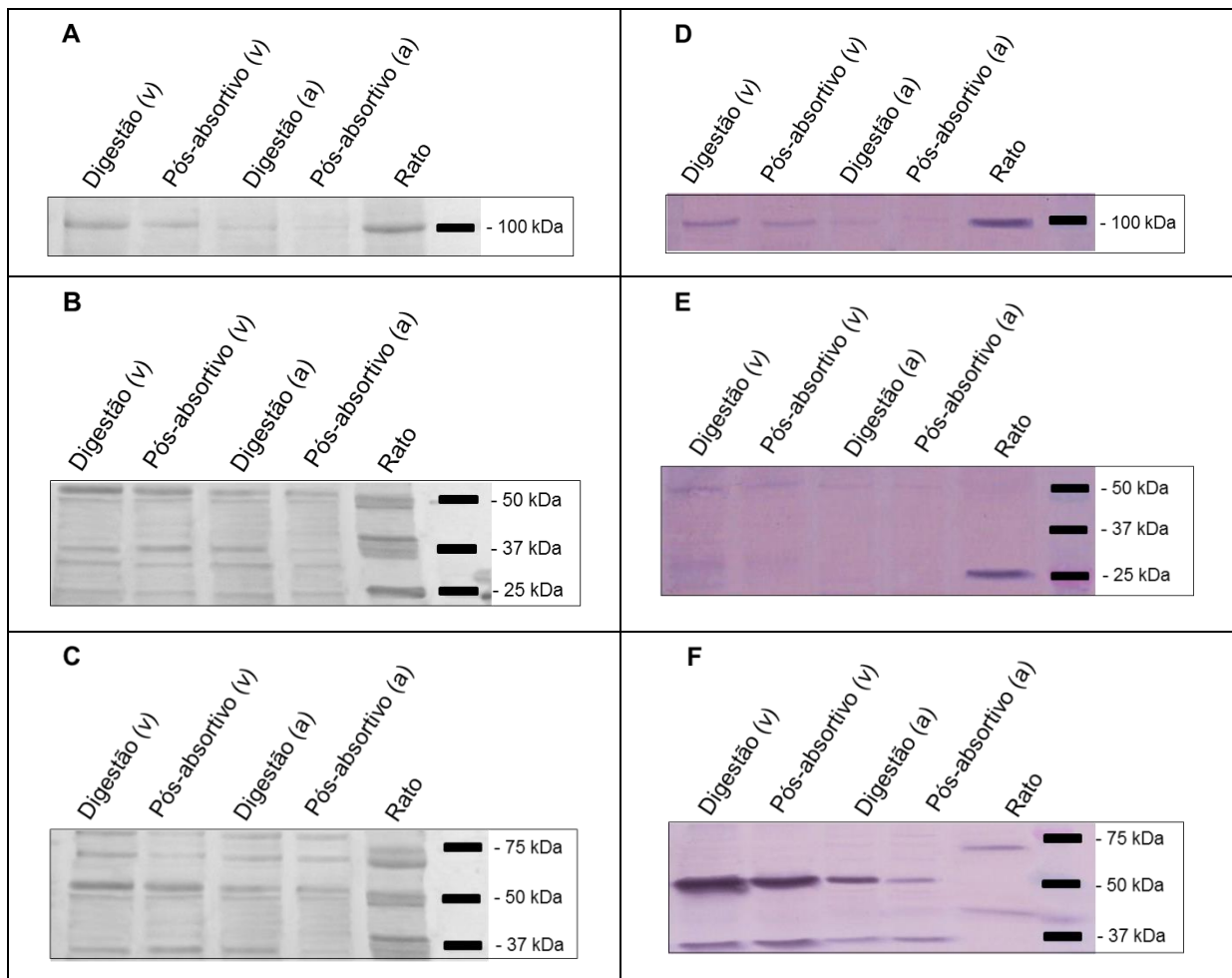


Figura 18. Análise da expressão proteica por SDS-PAGE (coluna da esquerda) e por Western blotting (coluna da direita) da SERCA2 (A), PLB (B), e do NCX (C), no ventrículo (v) e átrio (a) dos grupos alimentares Digestão e Pós-absortivo do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) e em ventrículo esquerdo do Rato Wistar (*Rattus Norvegicus*).

4.5. Análise molecular da SERCA2, do PLB e do NCX

Infelizmente, não foram encontradas sequências completas das proteínas de estudo em espécies de répteis ou anfíbios nos bancos de dados consultados. Assim, para possibilitar as análises comparativas de alinhamento e de possíveis sítios ativos, selecionou-se quatro espécies de mamíferos (dentre elas o *Rattus norvegicus*, espécie utilizada no presente estudo), uma ave e um peixe.

A tabela 5 mostra os sítios identificados da proteína SERCA2 após utilizar o banco de padrões de proteínas do PROSITE para coelho (*Oryctolagus cuniculus*), javali (*Sus scrofa*), rato (*Rattus norvegicus*), camundongo (*Mus musculus*), galinha (*Gallus gallus*) e o paulistinha (*Danio rerio*).

Foi possível verificar que a proteína SERCA2 nos quatro mamíferos analisados apresenta os mesmos sítios em igual quantidade.

Quando comparada aos mamíferos, a galinha apresenta quatro sítios a mais de fosforilação para a caseína quinase 2 (CK2), quatro sítios a mais de miristilação, um sítio a menos da proteína quinase C (PKC) e um sítio de amidação, sendo este último ausente nos mamíferos.

O peixe paulistinha, comparado aos mamíferos, apresenta dois sítios a mais da caseína quinase 2 (CK2), um sítio a mais de miristilação, três a menos de N-glicosilação, um a mais da proteína quinase C e um sítio de fosforilação em um resíduo de tirosina, este último ausente nas demais espécies.

Ao realizar o alinhamento da estrutura primária da SERCA2, utilizando o programa BioEdit, entre os mamíferos *Oryctolagus cuniculus*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus*, e o *Mus musculus*, foram encontradas 9 regiões conservadas (Anexo 1a).

Para os animais filogeneticamente mais distante como o *G. gallus* e o *D. rerio*, foi utilizado apenas o *Rattus norvegicus* para comparação, já que esse também foi utilizado como controle positivo no Western blotting. Entre o *R. norvegicus* e o *G. gallus* foram encontradas 7 regiões conservadas (Anexo 1b), e entre o *R. norvegicus* e o *D. rerio*, 9 regiões conservadas foram encontradas para a proteína SERCA2 (Anexo 1c).

Os sítios identificados para a proteína PLB são mostrados na tabela 6. Todos os quatro mamíferos e o *G. gallus* apresentam um sítio de fosforilação para proteína quinase dependente de cAMP e um sítio de fosforilação para a CK2. Já o *D. rerio*, além desses dois sítios, apresenta também um sítio de fosforilação para a PKC e um sítio de N-glicosilação.

Após o alinhamento da estrutura primária do PLB entre os mamíferos *Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Sus scrofa*, e o *Mus musculus*, foi encontrada apenas uma região conservada (Anexo 2a). Entre o *R. norvegicus* e o *G. gallus* também foi encontrada uma região conservada (Anexo 2b). Já entre o *R. norvegicus* e o *D. rerio* nenhuma região conservada foi encontrada para a proteína PLB.

Para a identificação dos possíveis sítios da proteína NCX (isoforma 1) foram selecionados duas outras espécies de mamíferos, o porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) e o boi (*Bos taurus*), substituindo o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) e o javali (*Sus scrofa*), já que essas duas últimas espécies não possuem a sequência completa da proteína NCX1 nos bancos de dados.

A tabela 7 mostra uma maior variação entre as espécies no número de sítios com a proteína NCX1, porém todos apresentam seis sítios ativos, somente o *R. novergicus* possui sete sítios. As principais diferenças foram um sítio de amidação presente somente no *R. novergicus* e no *D. rerio*, e a ausência do sítio DnaJ no *D. rerio*.

O alinhamento da estrutura primária do NCX1 entre os mamíferos mostrou 15 regiões conservadas (Anexo 3a). Entre o *R. novergicus* e o *G. gallus* foram encontradas 10 regiões conservadas (Anexo 3b). Já entre o *R. novergicus* e o *D. rerio* apenas uma região conservada foi encontrada para essa proteína (Anexo 3c).

Tabela 5. Nomes das espécies, números de acesso das sequências nos bancos de dados GenBank e UniProt e os tipos e número (n) de possíveis sítios ativos identificados na análise da proteína SERCA2 no banco de dados PROSITE.

Espécie	Números de acesso*	Sítios identificados (n)**
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	P20647	ATPase_E1_E2 (1) CK2-Phospho-site (11) Myristil (12) ASN-Glycosylation (7) PKC-Phospho-site (11)
<i>Sus scrofa</i>	P11607	ATPase_E1_E2 (1) CK2-Phospho-site (11) Myristil (12) ASN-Glycosylation (7) PKC-Phospho-site (11)
<i>Rattus norvegicus</i>	P11507	ATPase_E1_E2 (1) CK2-Phospho-site (11) Myristil (12) ASN-Glycosylation (7) PKC-Phospho-site (11)
<i>Mus musculus</i>	O55143	ATPase_E1_E2 (1) CK2-Phospho-site (11) Myristil (12) ASN-Glycosylation (7) PKC-Phospho-site (11)
<i>Gallus gallus</i>	Q9YGL9.1	ATPase_E1_E2 (1) CK2-Phospho-site (15) Myristil (16) ASN-Glycosylation (7) PKC-Phospho-site (10) Amidation (1)
<i>Danio rerio</i>	AAU14808.1	ATPase_E1_E2 (1) CK2-Phospho-site (13) Myristil (13) ASN-Glycosylation (4) PKC-Phospho-site (12) TYR-Phospho-site (1)

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

** A busca por sítios funcionais e domínios proteicos foi realizada utilizando o banco de padrões de proteínas do site PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) (GASTEIGER et al., 2005).

Tabela 6. Nomes das espécies, números de acesso das sequências nos bancos de dados GenBank e UniProt e os tipos e número (n) de possíveis sítios ativos identificados na análise da proteína PLB no banco de dados PROSITE.

Espécie	Números de acesso*	Sítios identificados (n)**
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	AAA31445.1	CAMP-Phospho-site (1) CK2-Phospho-site (1)
<i>Sus scrofa</i>	NP_999378.1	CAMP-Phospho-site (1) CK2-Phospho-site (1)
<i>Rattus norvegicus</i>	AAA41849.1	CAMP-Phospho-site (1) CK2-Phospho-site (1)
<i>Mus musculus</i>	AAH61097.1	CAMP-Phospho-site (1) CK2-Phospho-site (1)
<i>Gallus gallus</i>	AAA62738.1	CAMP-Phospho-site (1) CK2-Phospho-site (1)
<i>Danio rerio</i>	XP_005169911.1	CAMP-Phospho-site (1) CK2-Phospho-site (1) PKC-Phospho-site (1) ASN-Glycosylation (1)

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

** A busca por sítios funcionais e domínios proteicos foi realizada utilizando o banco de padrões de proteínas do site PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) (GASTEIGER et al., 2005).

Tabela 7. Nomes das espécies, números de acesso das sequências nos bancos de dados GenBank e UniProt e os tipos e número (n) de possíveis sítios ativos identificados na análise da proteína NCX1 no banco de dados PROSITE.

Espécie	Números de acesso*	Sítios identificados (n)**
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001257705.1	DNAJ-2 (1) ASN-Glycosylation (7) CK2-Phospho-site (27) Myristil (18) PKC-Phospho-site (12) TYR-Phospho-site (2) Amidation (1)
<i>Cavia porcellus</i>	NP_001166490.1	DNAJ-2 (1) ASN-Glycosylation (6) CK2-Phospho-site (26) Myristil (17) PKC-Phospho-site (13) TYR-Phospho-site (2)
<i>Mus musculus</i>	NP_035536.2	DNAJ-2 (1) ASN-Glycosylation (7) CK2-Phospho-site (28) Myristil (18) PKC-Phospho-site (12) TYR-Phospho-site (2)
<i>Bos taurus</i>	NP_788805.1	DNAJ-2 (1) ASN-Glycosylation (6) CK2-Phospho-site (28) Myristil (15) PKC-Phospho-site (13) TYR-Phospho-site (2)
<i>Gallus gallus</i>	NP_001072941.1	DNAJ-2 (1) ASN-Glycosylation (5) CK2-Phospho-site (25) Myristil (16) PKC-Phospho-site (13) TYR-Phospho-site (2)
<i>Danio rerio</i>	AAY17397.1	ASN-Glycosylation (5) CK2-Phospho-site (23) Myristil (21) PKC-Phospho-site (10) TYR-Phospho-site (1) Amidation (1)

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

** A busca por sítios funcionais e domínios proteicos foi realizada utilizando o banco de padrões de proteínas do site PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) (GASTEIGER et al., 2005).

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise da expressão proteica da SERCA2

Andersen et al. (2005) verificaram um crescimento de 40% na massa muscular ventricular de píton, *Phyton molurus*, dois dias após a alimentação com ratos com 25% da massa corpórea das serpentes (grupo SDA), sendo esta hipertrofia naturalmente revertida ao final do período de digestão. No presente estudo, as pítons do grupo Digestão também apresentaram hipertrofia cardíaca significativa, onde houve um aumento de 18,6% na massa ventricular com relação ao grupo Pós-absortivo (CIPRIANO, 2012).

Andersen et al. (2005) atribuíram este aumento na massa ventricular em *P. molurus* à hipertrofia miofibrilar, uma vez que encontraram um aumento na expressão das proteínas da cadeia pesada de miosina no grupo SDA, e sugeriram que esta hipertrofia cardíaca seria necessária para suprir a elevação da taxa metabólica devido à ingestão do alimento.

No presente trabalho, *P. molurus* apresentou uma maior expressão da SERCA2 no tecido ventricular do grupo Digestão ($12.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com relação ao grupo Pós-absortivo ($10.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), uma alteração devida às mudanças ocasionadas pela SDA. Além da maior expressão, o tecido ventricular do grupo Digestão expressou a proteína SERCA2 com uma menor massa molecular com relação aos outros grupos (Figura 13A). Essa mudança na expressão pode ter ocorrido devido ao estado metabólico do animal, onde o aumento do metabolismo provocado pela alimentação pode ter provocado mudança na massa molecular dessa proteína, sugerindo dessa forma a expressão de uma isoforma e/ou uma mudança na mobilidade no gel.

Cipriano (2012) verificou, em *P. molurus*, que o grupo Digestão apresentou uma maior força de contração com relação ao grupo Pós-absortivo, onde o miocárdio ventricular do grupo Pós-absortivo desenvolveu força de contração de aproximadamente 9 mN.mm^{-2} , enquanto que o grupo Digestão obteve aproximadamente 17 mN.mm^{-2} . Ao bloquear a função do RS utilizando a rianodina (um alcaloide de origem vegetal da espécie *Ryania speciosa* que mantém os canais de cálcio do RS parcialmente abertos, prevenindo o acúmulo de Ca^{2+} em seu interior, mostrando assim que o RS tem participação no fornecimento de cálcio para a contração ventricular destes animais), o autor verificou uma redução significativa

na força de contração no grupo Digestão na frequência de 0.2 Hz (~ 12 bpm) com relação ao grupo controle, já com o grupo Pós-absortivo não houve diferença significativa. Ainda segundo o autor, ao aumentar a frequência de estimulação elétrica em presença de rianodina, as tiras ventriculares do grupo Digestão foram capazes de se contrair de forma regular até a frequência de 1.2 Hz, enquanto o grupo controle atingiu 1.6 Hz, evidenciando assim uma maior dependência do RS para a ciclagem do Ca^{2+} em frequências maiores no grupo Digestão.

Periasamy & Kalyanasundaram (2007), estudando a proteína SERCA em vertebrados, verificaram que a expressão de isoformas pode ocorrer de acordo com o ambiente e/ou a situação em que o animal está, ou seja, as isoformas da proteína SERCA se adaptam para funções especializadas em diferentes condições e estas alterações podem afetar a sua expressão.

Castoe et al. (2008) observaram que proteínas mitocondriais em serpentes sofrem um processo evolucionário adaptativo que envolve substituições aceleradas de aminoácidos, particularmente em resíduos que são altamente conservados em vertebrados. Ainda segundo Castoe et al. (2013), essas extremas e rápidas mudanças nas proteínas mitocondriais podem influenciar genes nucleares envolvidos no metabolismo. Além disso, genes e também redes de genes associados com adaptações fisiológicas e fenotípicas extremas podem sofrer mudanças significativas de acordo com o ambiente em que o animal se encontra.

Dessa forma, a mudança no metabolismo da *P. molurus* provocado pela SDA pode ter ocasionado mudanças na expressão da proteína SERCA2, onde além de uma maior expressão, verificada pela quantificação proteica, houve possivelmente, a expressão de uma proteína isoforma no tecido ventricular do grupo Digestão com em relação ao grupo Pós-prandial, comprovado pela menor massa molecular.

Outra hipótese com relação à massa molecular é uma mudança na mobilidade da SERCA2 no gel, provocada pela expressão dessa isoforma e/ou por uma menor fosforilação em possíveis sítios ativos (discutido com mais detalhes no subitem 5.4). Sendo assim, nossos resultados sugerem que essas mudanças que ocorreram na expressão da SERCA2 em *P. molurus* contribuem para uma maior ciclagem do cálcio, principalmente na frequência de 0.2 Hz e em frequências maiores de 1.2 Hz.

Com relação à expressão da SERCA2 na cascavel, *Crotalus durissus terrificus*, Paula (2012), ao analisar a contratilidade miocárdica ventricular bloqueando o RS com o alcaloide rianodina, encontrou uma queda na força de

contração de cerca de 40% nos grupos alimentares Digestão e Pós-absortivo, e uma queda de cerca de 20% no grupo Jejum, não houve hipertrofia cardíaca no grupo Digestão e Pós-absortivo e nem perda da massa ventricular no grupo Jejum (1 ano após a última alimentação), mostrando assim que o RS tem uma importante participação no fornecimento de cálcio para a contração cardíaca destes animais.

Ainda segundo a autora, ao realizar a relação força-frequência com os três grupos alimentares, os grupos Digestão e Pós-absortivo mantiveram diferenças significativas entre as frequências de 0.2 Hz a 2.0 Hz com relação ao grupo controle. Já o grupo Jejum apresentou diferença significativa nas frequências de 0.2 Hz a 0.4 Hz e 1.2 Hz a 1.6 Hz, não havendo diferença entre as frequências de 0.6 Hz a 1.0 Hz, mostrando assim uma maior participação dos mecanismos sarcolemas e uma menor dependência do RS nessas frequências.

Desse modo, a confirmação da expressão da SERCA2 corrobora que o RS é funcional nessa espécie nos três regimes alimentares e a diferença na expressão encontrada neste estudo mostra que a sua expressão pode estar relacionada aos níveis de força de contração e a dependência do RS. Assim, os grupos alimentares Digestão e Pós-absortivo apresentaram uma maior expressão dessa proteína e uma maior dependência do RS enquanto o grupo Jejum mostrou uma menor expressão desta proteína e uma menor dependência do RS, principalmente nas frequências entre 0.6 Hz a 1.0 Hz, ficando evidente uma maior participação dos mecanismos sarcolemas na contratilidade cardíaca nessa faixa de frequência.

Galli et al. (2006b) estudaram a função cardíaca da tartaruga americana, *Trachemys scripta*, da serpente píton real, *Python regius*, do lagarto teiú, *Tupinambis meriana*, e do lagarto varanídeo, *Varanus exanthematicus*. Os autores verificaram que estes répteis recrutam o Ca^{2+} para o desenvolvimento de força de forma tecido-específica e frequência-específica. De forma geral, os efeitos da rianodina foram mais pronunciados no tecido atrial que no ventricular. No músculo ventricular, os autores verificaram efeitos significativos da rianodina apenas em pítons e lagartos varanídeos, nos quais a força contrátil foi significativamente reduzida em frequências fisiologicamente relevantes para essas espécies. Dessa forma, fica clara a grande plasticidade cardíaca que os répteis apresentam.

Desse modo, em *C. durissus*, a menor expressão da SERCA2 no grupo alimentar Jejum corrobora um inotropismo com relação ao RS de forma frequência-específica.

Lopes (2013) encontrou um aumento de 7,7% na massa ventricular do jacaré-de-papo-amarelo 48 horas após a ingestão do alimento. A 30 °C, a SDA causou efeito inotrópico positivo de modo que tanto a ampliação da massa ventricular quanto a ampliação do inotropismo devem contribuir para o desenvolvimento do débito cardíaco durante o evento da digestão neste animal. Ainda segundo o autor, no grupo Pós-absortivo a adição de rianodina não causou diferenças significativas nos valores da relação força-frequência em relação ao controle. Já no grupo Digestão, a relação força-frequência não foi afetada por este alcaloide em frequências de 0.2 Hz a 1.2 Hz com relação ao grupo controle, mas uma redução significativa da força de contração nas frequências entre 1.4 Hz a 1.8 Hz, o que sugere que o RS desempenha um papel crítico na manutenção do débito cardíaco em frequências mais elevadas.

A importância relativa do Ca^{2+} do RS na ativação da contração muscular varia consideravelmente entre diferentes espécies, nos diferentes estágios de desenvolvimento, em diferentes frequências de estimulação e temperaturas (FABIATO, 1982; BERS, 1991). Tais diferenças fisiológicas podem ter como base, distinções anatômicas e estruturais dos miócitos. A densidade do RS (geralmente mais esparsa em rãs e em peixes quando comparados aos encontrados em mamíferos), a presença de túbulos transversos (ausente em peixes e algumas espécies de anfíbios e répteis já estudadas), variações no diâmetro dos miócitos (diâmetro reduzido dos miócitos dos peixes) e a distribuição das miofibrilas no citosol, são base de importantes diferenças fisiológicas, principalmente em relação à origem do cálcio a ser utilizado pelo aparato contrátil (TIBBITS et al., 1991).

Portanto, a maior expressão da SERCA2 em *C. latirostris* com o grupo Digestão, mostra a importância do RS principalmente em altas frequências durante o período da SDA. Já em menores frequências cardíacas e em frequências acima de 2.0 Hz, tudo indica que esse animal utiliza mais os mecanismos sarcolemais no manejo de Ca^{2+} para garantir a contratilidade cardíaca nesse estado metabólico.

5.2. Análise da expressão proteica do PLB

Tanto em *P. molurus* quanto em *C. latirostris*, praticamente não houve diferença na quantificação da proteína PLB em função do regime alimentar ou do tecido cardíaco (atrial e ventricular). Somente *C. durissus* apresentou diferenças de expressão entre os grupos alimentares (Tabela 3), tanto no tecido ventricular (Figura 14B) quanto no tecido atrial (Figura 15B), onde houve uma relação direta entre a expressão da SERCA2 e a expressão do PLB, de acordo com o regime alimentar.

Will et al. (1984), ao realizarem um estudo sobre a relação entre a expressão das proteínas PLB e SERCA em tecido cardíaco de mamíferos, aves, anfíbios e peixes, revelaram que a proporção expressa dessas proteínas pode não ser constante entre elas e difere dependendo da espécie.

Haghighi et al. (1997) verificaram a presença de elementos regulatórios, localizados a pelo menos 600 pares de bases à montante (upstream) da região promotora do gene PLB, e elementos repressores, localizados na região intragênica dessa proteína, sendo que ambos possuem a capacidade de modular a expressão gênica do PLB.

Desse modo, podemos concluir que vários mecanismos moleculares podem influenciar a expressão do PLB e que a sua expressão pode variar de acordo com a espécie, com o ambiente e com as condições em que o animal se encontra, não havendo assim uma necessária relação direta com a expressão da SERCA2.

Com relação à massa molecular, as três espécies de répteis analisadas nesse estudo expressaram a proteína PLB com 50 kDa. Já o rato Wistar, assim como outros mamíferos, expressam essa proteína com massa molecular de 25 kDa (CURRIE & SMITH, 1999).

Num estudo realizado por Simmerman & Jones (1998) utilizando 7 espécies de mamíferos, apenas uma única proteína PLB foi encontrada, não havendo isoformas. Toyofuku & Zak (1991) estudaram a galinha (*Gallus gallus domesticus*) e encontraram uma maior diferença na sequência de aminoácidos com relação aos mamíferos, o que sugere uma diferença ainda maior entre mamíferos e répteis. Cabe ressaltar que os répteis surgiram no período carbonífero, a cerca de 340 milhões de anos, e as aves surgiram no período jurássico, a cerca de 150 milhões de anos (POUGH et al., 2005). Dessa forma, a grande distância evolutiva entre esses grupos pode ter sido capaz de gerar proteínas com diferenças nos seus

resíduos de aminoácidos e, conseqüentemente, com massas moleculares diferentes.

Mesmo havendo uma grande similaridade entre as espécies analisadas, uma vez que todos os genes possuem dois éxons separados por um íntron, o gene da proteína PLB possui algumas diferenças interespecíficas. Na galinha, o gene possui 10 kb com uma região intragênica de 6,5 kb separando os dois éxons (TOYOFUKU & ZAK, 1991). Em coelho, o gene possui 13,2 kb e os seus dois éxons são separados por um íntron de 10,5 kb (FUJII et al., 1991). No rato, o gene tem 12,5 kb com os dois éxons separados por um íntron de 6,5 kb (JOHNS & FELDMAN, 1992).

Todos os genes apresentam uma grande região intragênica e diferenças no tamanho dos seus éxons e do íntron. Sendo assim, a distância evolutiva que separa os grupos de animais acima descritos do grupo dos répteis (para os quais ainda não há um estudo detalhado sobre o gene desta proteína) pode ter ocasionado o surgimento de isoformas entre estes grupos.

Janke & Arnason (1997) sequenciaram o genoma mitocondrial do *Alligator mississippiensis* e, ao analisar as proteínas codificadas por esses genes mitocondriais, verificaram um processo evolutivo que é praticamente o mesmo encontrado em mamíferos e mais rápido do que em aves. Ainda segundo os autores, este estudo contradiz a hipótese de que altas taxas de mudanças moleculares estão relacionadas ao metabolismo elevado dos endotérmicos. Ao analisarem a sequência de aminoácidos mitocondriais de *A. mississippiensis*, esses autores sugeriram que a divergência entre as linhagens de aves e crocodilos deve ter ocorrido num tempo evolutivo ainda maior do que o que se pensava, a cerca de 254 milhões de anos.

A SERCA2a é continuamente inibida pelo fosfolambam (PLB), o efeito inibitório do PLB sobre a atividade da SERCA2a é revertido quando o PLB é fosforilado no resíduo serina-16 (pela proteína quinase A) ou na treonina-17 (pela Ca^{2+} /Calmodulina). Os anticorpos monoclonais se ligam perto dos sítios de fosforilação desses resíduos (CANTILINA, et al., 1993; MORRIS et al., 1991). Quatro resíduos carregados positivamente, um carregado negativamente, dois resíduos alanina e os resíduos fosforilados (serina 16 e treonina 17) são regiões estruturais necessárias para o funcionamento do PLB (TOYOFUKU et al., 1994).

Portanto, baseado no modelo neutralista de Kimura (1983) que prediz uma baixa taxa de mutação em moléculas com intensa restrição funcional, podemos supor que as regiões necessárias para o funcionamento do PLB se mantiveram

conservadas, regiões essas compostas por poucos resíduos. Já as regiões menos importantes podem ter sofrido modificações, como o aumento de resíduos nessa proteína e/ou mudanças nos seus aminoácidos, gerando dessa forma as isoformas encontradas no presente estudo.

A duplicação gênica também pode gerar proteínas modificadas e aumentar a sua vantagem evolutiva, onde, muitas vezes, a duplicação tem a vantagem de não produzir duas proteínas diferentes, mas sim, de colocar os genes duplicados sob diferentes mecanismos regulatórios (metabólico, desenvolvimento ou tecido-específico) (MCKEOWN et al., 1982).

Processos celulares como o splicing alternativo, modificações pós-traducionais, a presença de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) em regiões codificadoras e não codificadoras e até mesmo SNPs considerados “silenciosos”, que resultam em códon de substituição sinônima, podem gerar uma proteína modificada (KOMAR, 2007).

A fosforilação da proteína PLB pode influenciar a sua mobilidade no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), porém esta fosforilação não causa uma grande mudança. Wegener & Jones (1984) verificaram que a máxima fosforilação da PLB pelas proteínas quinases PKA ou pela CAMKII alterou sua mobilidade de 25 kDa para apenas 27 kDa. Portanto, nossos dados sugerem que esta diferença na massa molecular encontradas para os animais do presente estudo com relação aos mamíferos sejam realmente proteínas isoformas.

5.3. Análise da expressão proteica do NCX

O NCX é o principal mecanismo de efluxo do cálcio na maioria dos vertebrados ectotérmicos e atua na entrada de cálcio, quando em seu modo reverso (VORNANEN, 1996; VORNANEN, 1999). O funcionamento da troca entre Na^+ e Ca^{2+} é um processo determinado pelos gradientes eletroquímicos para ambos os íons através da sarcolema, de forma que o NCX é sensível ao potencial de membrana. Em potenciais de repouso normais e durante a maior parte do potencial de ação, o NCX retira Ca^{2+} da célula (modo normal). Já durante a fase ascendente do potencial de ação cardíaco, o NCX pode reverter a direção e trazer Ca^{2+} para o interior da célula no seu modo reverso (MULLINS, 1979). Desta forma, o sistema

de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ não é apenas a principal via de efluxo de Ca^{2+} como também, a princípio, pode mediar parte do influxo sarcolemal de Ca^{2+} .

Bers (2002) observou que a funcionalidade do NCX pode variar de acordo com a espécie. Ele observou que o NCX foi responsável por retirar 28% do Ca^{2+} ativador para promover o relaxamento dos miócitos cardíacos de coelhos e apenas 7% do total da concentração de Ca^{2+} ativador em ratos adultos.

Ao analisar a expressão da proteína NCX no músculo cardíaco da píton, o grupo Digestão em ambos os tecidos, atrial e ventricular, apresentou uma maior expressão com relação ao grupo Pós-absortivo (Figura 13C).

Cipriano (2012), ao estudar o efeito do aumento da frequência de estimulação elétrica sobre a força de contração (F_c) desenvolvida pelas tiras ventriculares de *P. molurus* verificou que, sob efeito da rianodina, o grupo Digestão não apresentou diferença com relação ao grupo controle entre as frequências de 0.4 Hz a 1.2 Hz e o grupo Pós-absortivo também não apresentou diferença entre as frequências de 0.2 Hz a 1.2 Hz. Estes dados mostram que neste intervalo de frequências, os mecanismos sarcolemais de transporte de Ca^{2+} são mais representativos no desenvolvimento de força de contração (F_c).

A partir desses dados, podemos sugerir que a expressão do NCX, comprovada pelo Western blotting, confirma a presença desta proteína e seu papel na ciclagem de Ca^{2+} em *P. molurus*, corroborando a hipótese de uma maior contribuição do NCX nas frequências sugeridas por Cipriano (2012), tanto na extrusão do Ca^{2+} para o relaxamento quanto no influxo do Ca^{2+} ativador para a contração no seu modo reverso.

Galli et al. (2006b), estudando a tartaruga da orelha vermelha (*Trachemys scripta*), verificaram que nesta espécie o RS desempenha pequeno papel na ciclagem de Ca^{2+} e sugeriram que o NCX pode fornecer o Ca^{2+} ativador para contração e é capaz de manter a contração dos miócitos independentemente do RS e dos canais L.

Desse modo, a manutenção da F_c nos grupos Digestão e Pós-absortivo, mesmo sem a participação do RS devido ao seu bloqueio com a rianodina (CIPRIANO, 2012), sugere uma maior atividade do NCX e que essa proteína pode garantir o inotropismo e, conseqüentemente, o débito cardíaco, podendo ser um dos principais mecanismos da ciclagem de Ca^{2+} em *P. molurus*.

Já com a cascavel sul-americana a maior expressão ocorreu no grupo Jejum, que apresentou maior expressão em ambos os tecidos cardíacos com relação aos outros dois grupos alimentares (Figura 14C e 15C).

Paula (2012) verificou que ao bloquear os canais de rianodina, o grupo Jejum apresentou uma queda significativa (cerca de 20%) na força de contração em relação ao obtido em solução fisiológica controle, porém esta queda foi menor do que a registrada para os grupos Pós-absortivo e Digestão (cerca de 40%) na frequência de 0.2 Hz. Esta diferença sugere que, durante o jejum, menos cálcio é armazenado dentro do retículo sarcoplasmático. Isso pode se dar em função da baixa quantidade de ATP disponível para o bombeamento ativo de cálcio via SERCA.

Ainda de acordo com Paula (2012), apesar da redução do estoque de cálcio dentro do RS, não houve redução na força de contração desenvolvida durante o Jejum quando comparada aos grupos Pós-absortivo e Digestão em solução fisiológica controle na frequência de 0.2 Hz, levantando a hipótese de que o cálcio disponível para a contração se mantém estável mesmo durante a privação alimentar.

Uma maior expressão do NCX juntamente com uma menor expressão da SERCA2 e do PLB com o grupo Jejum em relação aos outros dois grupos alimentares sugere uma maior mobilização do cálcio por essa proteína nesse regime de alimentação, corroborando assim com os resultados de Paula (2012).

O cálcio que promove a interação actomiosínica (Ca^{2+} ativador) pode provir do meio extracelular, pela sarcolema, através dos canais voltagem-dependentes do tipo L (canais lentos) e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) ativado no modo reverso e, também, de reservas intracelulares, provenientes do RS e do transportador uniporter presente na mitocôndria. Para ocorrer o relaxamento do músculo cardíaco, a retirada do cálcio pode ser realizada pela Ca^{2+} -ATPase sarcolemal, pela Ca^{2+} -ATPase do RS, pelo NCX e pelo transportador uniporter mitocondrial. Dessas quatro vias de retirada de Ca^{2+} apresentadas, as duas Ca^{2+} -ATPases consomem ATP.

Portanto, para um animal em jejum e com pouca energia, a utilização do NCX, um transportador eletroquímico que pode operar na ausência de ATP (BLAUSTEIN & LEDERER, 1999; BERBERIÁN et al. 2012), e do transportador uniporter mitocondrial, que também é eletroquímico e opera sem ATP (CROMPTON & HEID, 1978, KIRICHOK et al. 2004), podem ser boas opções. Desse modo, o aumento na expressão do NCX e a menor expressão da SERCA2 no grupo Jejum sugerem que

esta última trabalha menos, pela diminuição na produção de ATP, e que o NCX, por ser menos custoso, aumenta a sua atividade.

Já a participação da mitocôndria é de cerca de 1% em mamíferos (BERS, 2002) e não há registros na literatura da participação dessa organela na ciclagem do cálcio em animais basais.

Durante o desenvolvimento cardíaco, mudanças recíprocas na expressão do NCX e da SERCA podem ocorrer (VETTER et al., 1995). De acordo com O'Rourke et al. (1999), a expressão do NCX pode aumentar significativamente em miocárdio de cães com insuficiência cardíaca. Aumentos na expressão do NCX também foram observados no miocárdio de porcos, coelhos e ratos com insuficiência cardíaca (POGWIZD et al., 2001; SIPIDO et al., 2000; AHMMED et al., 2000; LITWIN & BRIDGE, 1997).

Trabalhos realizados com humanos verificando a razão entre o NCX e a SERCA, mostraram que o nível da expressão proteica do NCX pode aumentar em até 3 vezes com relação a SERCA em pessoas com insuficiência cardíaca. Esta mudança pode ser causada pelo aumento da expressão do NCX, pela diminuição da expressão da SERCA, ou por ambos os mecanismos (HASENFUSS et al., 1999).

Ao realizar o protocolo da relação força-frequência em *C. durissus* sob efeito da rianodina, Paula (2012) observou que os grupos Digestão e Pós-absortivo apresentaram diferença significativa com relação ao grupo controle em frequências entre 0.2 Hz e 2.0 Hz. Já no grupo Jejum, não houve diferença entre os valores de Fc obtidos em presença ou ausência de rianodina nas frequências de 0.6 Hz a 1.0 Hz. Quando a autora comparou a Fc dos três grupos alimentares, o grupo Jejum apresentou uma maior capacidade de gerar tensão quando comparado ao grupo Pós-absortivo entre as frequências de 0.6 Hz e 0.8 Hz, indicando desse modo uma maior representatividade dos mecanismos sarcolemais nesse grupo alimentar.

Baumer et al. (1998) verificaram que uma maior expressão do NCX em camundongo transgênico proporcionou um aumento significativo na força de contração cardíaca, mesmo sem haver aumento na expressão da SERCA2, do PLB e da Calsequestrina, e também sem hipertrofia nas fibras cardíacas, confirmando assim que esta proteína pode proporcionar um efeito inotrópico positivo.

Sendo assim, a expressão do NCX mostra uma grande plasticidade, podendo aumentar ou diminuir a sua expressão acompanhando as mudanças fisiológicas que ocorrem como o prolongado jejum alimentar em *C. durissus*, sendo capaz de garantir a contratilidade nesse regime alimentar.

Lopes (2013) verificou que a rianodina não causa alterações significativas na relação força-frequência das tiras ventriculares de *C. latirostris* do grupo Pós-absortivo, em frequências de 0.2 Hz a 1.8 Hz, e no grupo Digestão, em frequências de 0.2 Hz a 1.2 Hz e de 2.0 Hz a 2.4 Hz, ambos com relação ao grupo controle. Entretanto, no grupo Digestão a rianodina causou uma redução significativa da força de contração com relação ao grupo controle em frequências entre 1.4 Hz a 1.8 Hz, indicando uma maior participação do RS neste intervalo de frequências (discutido no subitem 5.1). Adicionalmente, as tiras ventriculares contraíram-se regularmente até 2.4 Hz no grupo Digestão e até 1.8 Hz no grupo Pós-absortivo. Desse modo, fica evidente que os mecanismos sarcolemas parecem ser mais eficientes para garantir o efeito inotrópico positivo nessas faixas de frequências.

A expressão do NCX corrobora a participação dessa proteína no manejo de Ca^{2+} em *C. latirostris* em ambos os grupos alimentares, porém, o grupo Digestão apresentou uma maior expressão com relação ao grupo Pós-absortivo, tanto no tecido ventricular quanto com o atrial (Figura 16C). Portanto, essa maior expressão do NCX para o grupo Digestão reforça a ideia de que tal mudança permitiu que as tiras ventriculares desse grupo pudessem se contrair a maiores frequências, quando comparadas ao grupo Pós-absortivo lembrando que, *in vitro*, o RS das mesmas estava com a sua função bloqueada pela rianodina.

Muitos estudos realizados com mamíferos mostraram que apesar do influxo de cálcio através dos canais L da sarcolema ser variável nas diferentes espécies, este é insuficiente para suportar a contração (BERS, 1991; CHAPMAN, 1983). Nas espécies estudadas, a retirada de cálcio se dá principalmente via SERCA e via NCX, sendo que a Ca^{2+} -ATPase sarcolemal e o transportador uniporter mitocondrial constituem o chamado sistema lento de ciclagem de cálcio e apresentam pouca influência para o relaxamento (BASSANI & BASSANI, 2002).

Portanto, nossos resultados com o *C. latirostris* sugerem que o NCX proporcionou uma maior dinâmica do cálcio, mesmo com o RS bloqueado, trabalhando tanto no efluxo como também no influxo sarcolemal do Ca^{2+} , e a maior expressão no grupo Digestão proporcionou um maior inotropismo de forma frequência-específica.

Os três grupos alimentares assim como o rato expressaram o NCX com duas bandas. Porém, a massa molecular das bandas diferiu não apenas entre as espécies de répteis estudadas como em relação ao rato.

Estudos mostram que a estrutura do gene do NCX1 é quase idêntica em mamíferos (BLAUSTEIN & LEDERER, 1999). Entretanto, o NCX1 possui 6 éxons: um par exclusivo chamado de A e B que podem se combinar com C, D, E, e F, conhecidos como éxons cassetes. Tais combinações podem dar origem a até 32 isoformas distintas de NCX através do splicing alternativo (SCHULZE et al., 1996).

A proteína NCX é formada por nove segmentos transmembrana (KHANANSHVILI, 2012). Todas as proteínas NCX possuem dois domínios homólogos altamente conservados chamados de alfa 1 e alfa 2, localizados nos segmentos transmembrana 2 e 7 (JOHN et al., 2013). Esses domínios podem ter surgido a partir de um evento de duplicação gênica (PHILIPSON & NICOLL, 2000; SCHWARZ & BENZER, 1997; CAI & LYTTON, 2004). Estudos demonstraram que ambos os domínios são fundamentais para a ligação dos íons e posterior translocação através da membrana (PHILIPSON & NICOLL, 2000; NICOLL et al., 1996).

Recentemente foi descoberto o quarto gene NCX, esse gene codifica o NCX4, que é encontrado exclusivamente no genoma de teleósteos, anfíbios e répteis (ON et al., 2009). Ainda segundo os autores, ao analisar a expressão do NCX4 no teleósteo Zebrafish, essa proteína foi encontrada no fígado, rins, coração, brânquias, intestino, olhos e no cérebro.

Pequenas diferenças na proteína NCX podem atender as necessidades específicas de diferentes tecidos em várias espécies que são constantemente expostas a rápidas mudanças ambientais. Desse modo, a presença das quatro proteínas NCX na maioria dos vertebrados indica que a seleção atuou para preservar essas proteínas homólogas distintas. Assim, a perda do NCX4 em mamíferos e possivelmente nas aves, sugere a perda de uma potencial especialização funcional (ON et al., 2008).

Portanto, as diferenças na massa molecular encontradas na expressão do NCX das 3 espécies de répteis analisadas no presente estudo sugerem a expressão de proteínas isoformas nesses animais. Alternativamente, as diferenças nas massas moleculares poderiam dever-se à expressão do NCX4, visto que tal proteína pode também ser expressa no coração e é encontrada em répteis. Entretanto, apenas o sequenciamento dos aminoácidos dessas proteínas poderia elucidar tais diferenças.

De acordo com o modelo neutralista de Kimura (1983), diferentes partes do mesmo gene frequentemente evoluem a diferentes taxas e estas diferenças estão relacionadas à função do gene e aos efeitos combinados da seleção natural e da

deriva genética. Sendo assim, regiões como os domínios do NCX que são fundamentais para a translocação dos íons permaneceram conservadas na escala evolutiva dos vertebrados. Já outras regiões de genes que codificam o NCX podem ter sofrido mudanças gerando, dessa forma, possíveis proteínas isoformas como as encontradas no presente estudo.

Studer et al. (1994), estudando o miocárdio humano, concluíram que a presença dos fragmentos de 70 kDa e 40 kDa é devida a ação proteolítica pois, utilizando a técnica de Western blotting, verificaram que o mesmo anticorpo reconheceu os dois fragmentos, confirmando assim que esses fragmentos proteolíticos representam a proteína NCX. A presença de duas bandas na expressão do NCX devida à ação de enzimas proteolíticas já havia sido sugerida por Nicoll et al. (1991).

Desse modo, as duas bandas encontradas nos répteis, sugere a ação de enzimas proteolíticas em diferentes locais do NCX de acordo com a espécie, gerando assim bandas com diferentes massas moleculares.

5.4. Análise molecular da expressão das proteínas SERCA2, PLB e NCX

Foi possível detectar a expressão das proteínas SERCA2, PLB e NCX tanto no tecido cardíaco ventricular quanto no tecido atrial dos répteis no presente estudo, mesmo utilizando anticorpos específicos para mamíferos, pois ainda não há anticorpos para tais proteínas construídos para répteis.

Proteínas derivadas de um ancestral comum são conhecidas como proteínas homólogas (HOLTJE & FOLKERS, 1997). Homologia entre sequências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional. (FILHO & ALENCASTRO, 2003).

Domínios proteicos pertencentes a uma determinada família geralmente compartilham características funcionais e é visível que certas regiões permanecem mais conservadas que outras durante a evolução. Essas são regiões importantes para a estrutura e função das proteínas e estão relacionadas com a pressão seletiva (LUND et al., 2005).

Desse modo, a confirmação da expressão das três proteínas deixa clara a existência de homologia entre as proteínas dos répteis e dos mamíferos, o que pôde

ser comprovado pela ligação dos anticorpos anti-SERCA, anti-PLB e anti-NCX em suas respectivas proteínas.

As análises da densidade óptica da SERCA, PLB e NCX mostraram uma menor expressão das mesmas no tecido atrial em comparação com o tecido ventricular. Koss et al. (1995) descreveram uma menor expressão do PLB e uma razão relativa do RNAm entre o PLB e a SERCA2 4,2 vezes menor em átrio em comparação ao ventrículo de camundongos. Ainda segundo os autores, essa menor expressão pode estar associado com os parâmetros basais da contratilidade atrial comparado ao músculo ventricular. Portanto, a menor expressão das proteínas atriais encontradas no presente estudo, pode estar relacionado aos diferentes parâmetros da contratilidade atrial com relação a contratilidade ventricular.

As análises dos sítios ativos da SERCA2 identificados no presente estudo mostram que as espécies de mamíferos apresentaram 42 sítios na estrutura primária dessa proteína, enquanto que a galinha (*G. gallus*) apresenta 50 sítios e o peixe paulistinha (*D. rerio*) 44 sítios. Talvez esse maior número de sítios do *G. gallus* explique o menor número de regiões conservadas (Anexo 1b) em comparação ao rato (*R. norvegicus*).

Essa diferença no número de sítios dos animais filogeneticamente mais distantes dos mamíferos, como o *G. gallus* e o *D. rerio*, reforça a ideia de que também pode haver diferenças na SERCA2 de *P. molurus* com relação aos mamíferos, sugerindo assim um maior número de sítios de fosforilação na serpente. A fosforilação pode influenciar a mobilidade da proteína no gel (WEGENER & JONES 1984), o que pode explicar a diferença encontrada na massa molecular da SERCA2 do tecido atrial do grupo Digestão e dos tecidos atrial e ventricular do grupo Pós-absortivo em relação ao tecido ventricular no grupo Digestão e do rato. O tecido ventricular no grupo Digestão pode ter sofrido uma menor fosforilação em alguns desses sítios devido a SDA, apresentando desse modo uma menor massa molecular, semelhante à do rato (Figura 13A).

O PLB, por ser uma proteína composta por uma sequência pequena de aminoácidos, apresenta apenas dois sítios ativos em todas as espécies selecionadas no banco de dados, à exceção do *D. rerio*, que mostrou quatro sítios ativos (Tabela 3). O alinhamento das sequências do PLB mostrou uma única sequência de aminoácidos conservada tanto entre os quatro mamíferos quanto entre *R. norvegicus* e o *G. gallus*. Já entre o *R. norvegicus* e o *D. rerio*, nenhuma sequência conservada foi encontrada. Entre os mamíferos a sequência conservada

vai do resíduo 3 ao 50 (Anexo 2a), enquanto entre o *R. novergicus* e o *G. gallus* vai do resíduo 34 ao 50 (Anexo 2b). Essas diferenças mostram que espécies de grupos filogeneticamente mais distantes apresentam maiores diferenças na sequência de aminoácidos dessa proteína e as regiões conservadas geralmente são menores. Esses dados reforçam a ideia de existência de diferenças no PLB de mamíferos com relação aos répteis, o que pode ter ocasionado o aparecimento de isoformas nestes últimos, conforme demonstrado pelos resultados de Western blotting (Figuras 13B, 14B, 15B e 16B).

A análise dos sítios ativos do NCX mostrou uma maior variação entre as espécies do que as vistas para as outras duas proteínas (Tabela 4). Essa maior diferença entre as espécies deve-se, provavelmente, ao fato do NCX1 ter a capacidade de produzir até 32 isoformas distintas através do splicing alternativo. O alinhamento das sequências de aminoácidos também apresentou grandes diferenças, havendo 15 regiões conservadas entre os mamíferos, 10 entre o *R. novergicus* e o *G. gallus* e apenas uma região entre o *R. novergicus* e o *D. rerio* (Anexo 3c). Assim, mais uma vez o número de regiões conservadas diminuiu quando se compara as espécies mais distantes na escala evolutiva.

As diferenças observadas no número de sítios ativos, a diminuição das regiões conservadas na comparação de animais filogeneticamente mais distantes juntamente com a grande plasticidade do NCX, reforça a ideia de que os répteis analisados no presente estudo expressaram proteínas isoformas.

6. CONCLUSÕES

- Existem regiões semelhantes entre as proteínas dos répteis com relação aos mamíferos, comprovada pela ligação dos anticorpos específicos para mamíferos anti-SERCA, anti-PLB e anti-NCX nas respectivas proteínas dos répteis.
- A ação dinâmica específica (SDA) levou a uma maior expressão da proteína SERCA2 nas três espécies de répteis.
- A SDA também pode ter induzido a expressão de uma isoforma e/ou uma menor fosforilação em alguns sítios ativos da SERCA2 no tecido ventricular de *P. molurus*.
- Uma relação direta entre a expressão da SERCA2 com a expressão do PLB foi verificada somente em *C. durissus*, não havendo tal relação em *P. molurus* e *C. latirostris*.
- As três espécies de répteis expressaram o PLB com mesma massa molecular, de 50 kDa, e diferente da do rato (25 kDa). A grande distância evolutiva que separa os répteis dos mamíferos pode ter ocasionado o surgimento de isoformas entre esses grupos, explicando tal diferença.
- O aumento da expressão do NCX em *C. latirostris* no grupo alimentar Digestão sugere uma maior mobilização do cálcio e um maior inotropismo de forma frequência-específica através dessa proteína.
- A maior expressão do NCX juntamente com a menor expressão da SERCA2 e do PLB em *C. durissus* no grupo alimentar Jejum em relação aos outros dois grupos alimentares sugere uma maior mobilização do cálcio pelo NCX nesse regime de alimentação, o que seria vantajoso do ponto de vista energético.
- A expressão do NCX com diferentes massas moleculares nas três espécies estudadas, um menor número de resíduos de aminoácidos conservados em animais filogeneticamente mais distantes e a grande plasticidade do gene NCX para formar proteínas distintas sugere a expressão de proteínas isoformas nos répteis estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOFF, M.D., MAGALHAES, P.J., RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, p. 36-42, 2004.

AHMED, G.U., DONG, P.H., SONG, G.J., BALL, N.A., XU, Y.F., WALSH, R.A., CHAMVIMONVAT, N. Changes in Ca cycling proteins underlie cardiac action potential prolongation in a pressure-overloaded guinea pig model with cardiac hypertrophy and failure. **Circulation Research**, v. 86, p. 558-570, 2000.

ALTSHULER, I., VAILLANT, J. J., XU, S., CRISTESCU, M. E. The evolutionary history of sarco(endo)plasmic calcium ATPase (SERCA). **Plos one**. v. 7, p. 1-6, 2012.

ALWINE, J.C., KEMP, D.J., STARK, G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, pp. 5350-5354, 1977.

ANDERSEN, J.B., ROURKE, V.J.C., BENNETT, A.F., HICKS, J.W. Postprandial cardiac hypertrophy in python. **Nature**, v. 434, p. 37-38. 2005.

ANDRADE, D.; CRUZ-NETO, A.; ABE, A.S. Meal Size And Specific Dynamic Action In The Rattlesnake *Crotalus durissus* (Serpentes: Viperidae). **Herpetologica**, v. 53, p. 485-493, 1997.

ARLOCK, P., KATZUNG, B. G. Effect of sodium substitutes on transiente inward current and tension in guinea-pig and ferret papillary muscle. **The Journal of Physiology**, v. 360, p. 105 – 120, 1985.

ÁVILA-PIRES, T.C.S. Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). **Zoologische Verhandelingen**, v. 299, p.1-706, 1995.

BASSANI, R.A., BASSANI, J.W.M. Contribution of Ca²⁺ transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. **American Journal of Physiology**, v. 282, p. 2406-2413, 2002.

BASSANI, R.A., BERS, D. M. Na-Ca exchange is required for rest-decay but not for rest potentiation of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 26, p. 1335-1347, 1994.

BAUMER, A.T., FLESH, M., KILTER, H., PHILIPSON, K.D., BOHM, M. Overexpression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger leads to enhanced inotropic responsiveness to Na⁺-channel agonist without sarcoplasmic reticulum protein changes in transgenic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, pp. 786-790, 1998.

BERBERIÁN, G., PODJARNY, A., DIPOLO, R., BEAUGÉ, L. Metabolic regulation of the squid nerve Na⁺/Ca²⁺ exchanger: Recent kinetic, biochemical and structural developments. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 108, p. 47-63, 2012.

BERS, D.M. Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in cardiac muscle activation during post-rest recovery. **American Journal of Physiology**. v. 248, p. 366-381, 1985.

BERS, D.M. **Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. 258p.

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

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

BISHOPRIC, N.H. Evolution of the Heart from Bacteria to Man. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1047, p. 13-29, 2005.

BLAUSTEIN, M.P., LEDERER, W.J. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. **Physiological Reviews**, 79:763-854, 1999.

BLAUSTEIN, M. P. The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v, 70, p. 33-82, 1974.

BOCALINI, D.S., SANTOS, L., ANTONIO, E.L., SANTOS, A.A., DAVEL, A.P.C., ROSSONI, L.V., VASSALLO, D.V., TUCCI, P.J.F. Myocardial remodeling after large infarcts in rat converts post rest-potential in force decay. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, p. 243-251, 2012.

BODMER, R. Heart development in Drosophila and its relationship to vertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 5, p. 21-28, 1995.

BOSSON, E.H., SOMMER, J.R. Comparative stereology of the lizard and frog myocardium. **Tissue and Cell**, v. 16, p. 173-178, 1984.

BÖHM, M., REIGER, B., SCHWINGER, R. H. G., ERDMANN, E. cAMP concentrations, cAMP dependent protein kinase activity, and phospholamban in non-failing and failing myocardium. **Cardiovascular research**, v. 28, p. 1713-1719, 1994.

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, p. 248-254, 1976.

BRAZAITIS, P.; YAMASHITA, C. & REBELO, G. 1990. **A summary report of the CITES central South American caiman study: Phase I: Brazil**. pp.100-115. In: Crocodiles. Proc. 9th Work. Meet. Croc. Spec. Group / SSC / IUCN. Vol. 1. IUCN - The World Conservation Union, Gland, Switzerland.

BRAZAITIS, P., WATANABE, M.E., AMATO, G. The caiman trade. **Scientific American**. New York. v. 278, p. 275-284, 1998.

BRETT, J. R. The metabolic demand for oxygen in fish, particularly salmonids, and a comparison with other vertebrates. **Respiration physiology**, v. 14, p. 183-192, 1972.

BRIGGS, F. N., LEE, K. F., WECHSLER, A. W., JONES, L. R. Phospholamban expressed in slow-twitch and chronically stimulated fast-twitch muscles minimally affects calcium affinity of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 26056-26061, 1992.

BRIGGS, N. F., LEE, K. F., FEHER, J. J., WECHSLER, A. S., OHLENDIECK, K., CAMPBELL, K. P. Ca-ATPase isozyme expression in sarcoplasmic reticulum is altered by chronic stimulation of skeletal muscle. **FEBS Letters**, v. 259, p. 269 – 272, 1990.

BRINI, M., CARAFOLI, E. Calcium pumps in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 1341-1378, 2009.

BRODY, S. **Bioenergetics and growth**. New York: Reinhold, 1945.

BRUNEAU, B.G. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. **Circulation Research**, v. 90, p. 509-519, 2002.

BUCKINGHAM, M., MEILHAC, S., ZAFFRAN, S. Building the mammalian Heart from two sources of myocardial cells. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 826-835, 2005.

BURK, S. E., LYTTON, J. MACLENNAN, D. H., SHULL, G. E. cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca^{2+} pump. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 18561-18568, 1989.

BURNETTE W.N. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, p. 195-203, 1981.

CAI, X., LYTTON, J. The cation/ Ca^{2+} exchanger superfamily: Phylogenetic analysis and structural implications. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p. 1692-1703, 2004.

CAMPBELL, A.M., KESSLER, P.D., SAGARA, Y., INESI, G., FAMBROUGH, D.M. Nucleotide sequences of avian cardiac and brain SR/ER $\text{Ca}(+2)$ -ATPases and functional comparisons with fast twitch $\text{Ca}(+2)$ -ATPase. Calcium affinities and inhibitor effects. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 16050–16055, 1991.

CANTILINA, T., SAGARA, Y., INESI, G. JONES, L.R. Comparative Studies of Cardiac and Skeletal Sarcoplasmic Reticulum ATPases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 17018-17025, 1993.

CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD JR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: SARVIER, 2003. 468p.

CASTOE, T.A., JIANG, Z.J., GU, W., WANG, Z.O., POLLOCK, D.D. Adaptive evolution and functional redesign of core metabolic proteins in snakes. **Plos One**, v. 3, p. 1-14, 2008.

CASTOE, T.A., KONING, A.P.J., HALL, K.T., CARD, D.C., SCHIELD, D.R., FUJITA, M.K., RUGGIERO, R.P., DEGNER, J.F., DAZA, J.M., GU, W. et al. The Burmese python genome reveals the molecular basis for extreme adaptation in snakes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p.20645-20650, 2013.

CHAPMAN, R.A. Control of cardiac contractility at the cellular level. **American Journal of Physiology**. v. 245, p. 535-552, 1983.

CIPRIANO, R.C. **Efeitos da alimentação e digestão na contratilidade miocárdica de pítons (*Python molurus*)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 73 f. 2012.

CRAMP, R.L., FRANKLIN, C.E. Arousal and re-feeding rapidly restores digestive tract morphology following aestivation in green-striped burrowing frogs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 451-460, 2005.

CRAMP, R.L., FRANKLIN, C.E. and MEYER, E.A. The impact of prolonged fasting during aestivation on the structure of the small intestine in the green-striped burrowing frog, *Cyclorana alboguttata*. **Acta Zoologica**, v. 86, p. 13-24, 2005.

CRIPPS, R.M., OLSON, E.N. Twist is required for muscle template splitting during adult drosophila myogenesis. **Developmental Biology**. v. 203, p. 106-115, 1998.

CROMPTON, M., HEID, I. The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, v. 91, p. 599-608. 1978.

CURRIE, S., SMITH, G. L. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity is increased in sarcoplasmic reticulum from coronary artery ligated rabbit hearts. **FEBS Letters**, v. 459, p. 244-248, 1999.

DRIEDZIC W.R., GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 221-258, 1994.

FABIATO, A. Calcium release in skinned cardiac cells: Variation with species tissues and development. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 41, p. 2238-2244, 1982.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **American Journal of Physiology**, v. 245, p. 1-14, 1983.

FILHO, O.A.S., ALENCASTRO, R.B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, p. 253-259, 2003.

FISHMAN M.C., OLSON E.N. Parsing the Heart: Genetic Modules for Organ Assembly. **Cell**, v. 91, p. 153-156, 1997.

FORBES, M.S., SPERELAKIS, N. Spheroidal bodies in the junctional sarcoplasmic reticulum of lizard myocardial cells. **Journal of Cell Biology**. v. 60, p. 602-615, 1974.

FUJII, J., LYTTON, J., TADA, M., MACLENNAN, D.H. Rabbit cardiac and slow-twitch muscle express the same phospholamban gene. **FEBS Letters**. v. 227, p. 51–55, 1989.

FUJII, J., ZARAIN-HERZBERG, A., WILLARD, H.F., TADA, M., MACLENNAN, D.H. Structure of the rabbit phospholamban gene, cloning of the human cDNA, and assignment of the gene to human chromosome 6. **The Journal of Biological Chemistry**, V. 266, p. 11669-11675, 1991.

GALLI, G.L.J., TAYLOR, E.W., SHIELS, H. A. Calcium flux in turtle ventricular myocytes. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, p. 1781-1789, 2006.

GALLI, G.L.J., GESSER, H., TAYLOR, E.W., SHIELS, H.A., WANG, T. The role of the sarcoplasmic reticulum in the generation of high heart rates and blood pressures in reptiles. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 1956-1963, 2006b.

GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., DUVAUD, S., WILKINS, M.R., APPEL, R.D., BAIROCH, A. **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server**. In: WALKER, J.M. *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 2005. pp. 571–607.

GÉLÉBART, P., MARTIN, V., ENOUF, J., PAPP, B. Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, p. 676-684, 2003.

GESSER, H., POUPA, O. Acidosis and cardiac muscle contractility: comparative aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76, p. 559-566, 1983.

GRENS, A., GEE, L., FISHER, A.D., BODE, H.R. CnNK-2, an NK-2 Homeobox Gene, Has a Role in Patterning the Basal End of the Axis in Hydra. **Developmental Biology**, v. 180, p. 473-488, 1996.

HAGHIGHI, K., KADAMBI, V.J., KOSS, K.L., LUO, W., HARRER, J.M., PONNIAH, S., ZHOU, Z., KRANIAS, E.G. In vitro and in vivo promoter analyses of the mouse phospholamban gene. **Gene**, v. 203, p. 199-207, 1997.

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

HELLE, K.B. Structures of functional interest in the myocardium of lower vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76, p. 447-452, 1983.

HASENFUSS, G., PIESKE, B. Calcium cycling in congestive heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, p. 951-969, 2002.

HERZBERG, A. Z., FERNÁNDEZ, G. A. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase-2 gene: structure and transcriptional regulation of the human gene. **The Scientific World Journal**. v. 2, p. 1469-1483, 2002.

HICKMAN-JR, C.P., ROBERTS, L.S., LARSON, A. **Integrated principles of zoology**. McGraw Hill, 11th ed. 2001, 1531 p.

HICKS, J.M.T.; BENNETT, A. Eat and run: prioritization of oxygen delivery during elevated metabolic states. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 144, p. 215-224, 2004.

HOLTJE, H.D., FOLKERS, G. Em **Molecular Modeling: Basic Principles and Applications**, Mannhold, R., Kubinyi, H., Timmerman, H., eds. VCH: Weinheim, 1997.

HUXLEY, H.E. The mechanism of muscular contraction. **Science**, v. 164, p. 1356-1366, 1969.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/ran//> Acesso em: 23 julho 2010.

IUCN 2008. **2008 IUCN Red List of threatened Species**. www.iucnredlist.org. Acesso em: 21 julho 2010.

JACKSON, K., PERRY, G. Changes in intestinal morphology following feeding in the brown treesnake, *Boiga irregularis*. **Journal of Herpetology**, v. 34, p. 459-462. 2000.

JANES, D.N., CHAPPELL, M.A. The effect of ratio size and body size on specific dynamic action in Adélie penguin chicks, *Pygoscelis adeliae*. **Physiological Zoology**, v. 68, p. 1029-1044, 1995.

JANKE, A., ARNASON, U. The Complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent archosauria (Birds and Crocodiles). **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 1266-1272, 1997.

JOHANSEN, K., BURGGREN, W.W. **Cardiovascular function in the lower vertebrates**. In *Hearts and Heart-like Organs*, Vol. 1 (ed. G. H. Bourne), p. 61-117. New York: Academic Press, 1980.

JOHN, S.A., LIAO, J., JIANG, Y. OTTOLIA, M. The cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger has two cytoplasmic ion permeation pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 7500-7505, 2013.

JOHNS, D.C., FELDMAN, A.M. Identification of a highly conserved region at the 5' flank of the phospholamban gene. **Biochemical and biophysical research**, v. 188, p. 927-933, 1992.

JUHASZOVA, M., AMBESI, A., LINDENMAYER, G. E., BLOCH, R. J., BLAUSTEIN, M. P. Na⁺-Ca²⁺ exchanger in arteries: identification by immunoblotting and immunofluorescence microscopy. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. C234-C242, 1994.

KHANANSHVILI, D. The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX) – Structure, function, and regulation in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, p. 220-235, 2012.

- KIMURA M. **The neutral theory of molecular evolution**. Cambridge University Press, Cambridge. 384 p. 1983.
- KIRICHOK, Y., KRAPIVINSKY, G., CLAPHAM, D. E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. **Nature**, v. 427, p. 360-364, 2004.
- KING, F.W. & BRAZAITIS, P. The identification of commercial crocodylian skins. **Zoologica NY**, v. 56, p. 15-70, 1971.
- KING, F.W., BURKE, R.L. **Crocodylian, tuatara, and turtle species of the world**. Washington: Association of Systematics Collection, 1989, 216 p.
- KLIEBER, M. **The fire of life, An Introduction to Animal Energetics**. Nova York: Krieger Huntington. 1975.
- KOBAN, M. U., MOORMAN, A. F. M., HOLTZ, J., YACOUB, M. H. Expressional analysis of cardiac Na-Ca exchanger in rat development and senescence. **Cardiovascular research**. v. 37, p. 405-423, 1997.
- KOMAR, A. A. SNPs, silent but not invisible. **Science**. v. 315, p. 466-467, 2007.
- KOSS, K.L., PONNIAH, S., JONES, W. K., GRUPP, I. L., KRANIAS, E. G. Differential phospholamban gene expression in murine cardiac compartments. **Molecular and Physiological Analyses**. v. 77, p. 342-353, 1995.
- KRAEV, A., CHUMAKOV, I., CARAFOLI, E. The organization of the human gene NCX1 encoding the sodium-calcium exchanger. **Genomics**, v. 37, p. 105-112, 1996.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 -685, 1970.
- LALLI, J., HARRER, J. M., LUO, W., KRANIAS, E. G., PAUL, R. J. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with a marked decrease in sensitivity in aortic smooth muscle. **Circulation research**, v. 80, p. 506 – 513, 1997.
- LEAK, L.V. The ultrastructure of myofibers in a reptilian heart: the Boa Constrictor. **American Journal of Anatomy**, v. 120, p. 553-582, 1967.
- LEBERER, E., HÄRTNER K, T., BRANDL, C. J., FUJII, J., TADA, M., MACLENNAN, D. H., PETTE, D. Slow/cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban mRNAs are expressed in chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. **European Journal of Biochemistry**, v. 185, p. 51 – 54, 1989.
- LEESON, T.S. The Fine Structure of Snake Myocardium. **Acta Anatomica**. v. 109, p. 252-269, 1981.
- LEKNES, I.L. Morphometric analysis of myocardial cells in a teleost. **Anatomischer Anzeiger**, v. 155, p. 169-172, 1984.

LI, Z. MATSUOKA, S., HRYSHKO, L. V., NICOLL, D. A., BERSOHN, M. M., BURKE, E. P. Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na⁺-Ca²⁺ exchanger. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 17434-17439, 1994.

LIGNOT, J.H., HELMSTETTER, C., SECOR, S.M., Postprandial morphological response of the intestinal epithelium of the Burmese python (*Python molurus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** 141, p. 280-291, 2005.

LINNAEUS, C. **Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis**. Holmiae Systema Nature. ed., 824 p, 1758.

LITWIN, S.E., BRIDGE, J.H.B. Enhanced Na-Ca exchange in the infarcted heart-implications for excitation-contraction coupling. **Circulatio Research**, v. 81, p. 1083-1093, 1997.

LOPES, A.G. **Efeitos da temperatura e do estado metabólico sobre a função cardíaca do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*)**. (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 85 f. 2013.

LUND, O., NIELSEN, M., LUNDEGAARD, C., KESMIR, C., BRUNAK, S. **Immunological Bioinformatics**. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts. 2005. 296 p.

MACLENNAN, D. H., KRANIAS, E. G. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. **Nature**, v. 4, p. 566-577, 2003.

MARTIN, V., BREDOUX, R., CORVAZIER, E., VAN GORP, R., KOVACS, T., et al. Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 24442-24452, 2002.

MCKEOWN, M., MACLEOD, C., FIRTEL, R. In **Muscle Development: Molecular and Cellular Control**, ed. M. L. Pearson, H. F. Epstein, pp. 61-76. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. 1982.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L., FRANÇA, F.O., FAN, H.W., MÁLAQUE, C.M., HADDAD, V., ed. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003, p. 33-61.

MOLINA, F.B.; PAOLA, L.; LISBOA, C.S. **Fundação Parque Zoológico de São Paulo**, Animais: Répteis: jacaré-de-papo-amarelo, 2003. Disponível em: <<http://www.zoologico.sp.gov.br/repteis/jacaredepapoamarelo.htm>>. Acesso em: 25 janeiro 2014.

MOORMAN, A.M., CHRISTOFFELS, V.M. Cardiac Chamber Formation: Development, Genes, and Evolution. **Physiological reviews**, v. 83, p. 1223-1267, 2003.

MORA, C., TITTENSOR, D., ADL, S., SIMPSON, A.G.B., WORM, B. How many species are there on earth and in the ocean? **Plos biology**, v. 9, p.1-8, 2011.

MORRIS, G.L., CHENG, H., COLYER, J., WANG, J.H. Phospholamban regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 11270-11275, 1991.

MOYES, C.D., SCHULTE, P.M. **Princípios de Fisiologia Animal**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MULLINS, L.J. The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. **American Journal of Physiology**, v. 236, p. C103-C110, 1979.

NECKÁR, J., MARKOVÁ, I., NOVÁK, F., NOVÁKOVÁ, O., SZÁRSZOI, O., OSTÁDAL, B., KOLÁR, F. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC- δ in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, p. H1566-H1572. 2005.

NICOLL, D. A., LONGONI, S., PHILIPSON, K. D. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. **Science**, v. 250, p. 562-565, 1990.

NICOLL, D. A., BARRIOS, B. R., PHILIPSON, K. D. Na⁺-Ca²⁺ exchangers from rod outer segments and cardiac sarcolemma: comparison of properties. **American Journal of Physiology**, v. p. C1212-C1216, 1991.

NICOLL, D. A., QUEDNAU, B. D., QUI, Z. Y., XIA, Y., LUSIS, A. J., PHILIPSON, K. D. Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 24914-24921, 1996.

NICOLL, D. A., HRYSHKO, L. V., MATSUOKA, S., FRANK, J. S., PHILIPSON, K. Mutation of amino acid residues in the putative transmembrane segments of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, pp. 13385-13391, 1996.

NEI, M., SUZUKI, Y., NOZAWA, M. The neutral theory of molecular evolution in the genomic era. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 11, p. 265-289, 2010.

OKITA, S. The fine structure of the ventricular muscle cells of the soft-shelled turtle heart (*Amyda*), with special reference to the sarcoplasmic reticulum. **Journal of Electron Microscopy**, v. 20, p. 107-119, 1971.

OLSON, E.N. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. **Science**, v. 313, p. 1922-1927, 2006.

ON, C., MARSHALL, C.R., PERRY, S.F., LE, H.D., YURKOV, V., OMELCHENKO, A., HNATOWICH, M., HRYSHKO, L.V., TIBBITS, G.F. Characterization of zebrafish (*Danio rerio*) NCX4: a novel NCX with distinct electrophysiological properties. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 296, p. C173-C181, 2009.

ON, C., MARSHALL, C.R., CHEN, N., MOYES, C.D., TIBBITS, G.F. Gene structure evolution of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX) family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 127, 2008.

OOTA, S., SAITOU, N., Phylogenetic relationship of muscle tissues deduced from superimposition of gene trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 856-867, 1999.

O'ROURKE, B., KASS, D.A., TOMASELLI, G.F., KAAB, S., TUNIN, R., MARBAN, E. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia induced heart failure, I: experimental studies. **Circulation Research**, v. 84, p. 562-570, 1999.

OVERGAARD, J., ANDERSEN, J. B., Wang, T. The effects of fasting duration on the metabolic response in Python: an evaluation of the energetic costs associated with gastrointestinal growth and up-regulation. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 75, p. 360-368. 2002.

PAULA, GABRIELLE SILVEIRA de. **Efeitos da alimentação/digestão e do jejum prolongado sobre a função cardíaca de cascavéis, *Crotalus durissus terrificus***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 165 f. 2012.

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

PHILIPSON, K.D., NICOLL, D.A. Sodium-calcium exchange: A molecular perspective. **Annual Review of Physiology**, v. 62, p. 111-133, 2000.

POGWIZD, S.M., SCHLOTTHAUER, K., LIE, L., YUAN, W., BERS, D.M. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure. **Circulation Research**, v. 88, p. 1159-1167, 2001.

POGWIZD, S.M., QI, M., YUAN, W., SAMAREL, A.M., BERS, D.M. Upregulation of Na/Ca exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. **Circulation Research**, v. 85, p. 1009-1019, 1999.

POUGH, F.H.; ANDREWS, R.M.; CADLE, J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITZKY, A.H.; WELLS, K.D. **Herpetology**. 3^o ed. Nova Jersey: Person Prentice Hall, 2008.

POUGH, F.H., JANIS, C.M., HEISER, J.B. **Vertebrate life**. 7th ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005.

POUGH, F.H., ANDREWS, R.M., CADLE, J.E., CRUMP, M.L., SAVITZKY, A.H., WELLS, K.D. **Herpetology**. Prentice Hall, Upper Saddle River. 1998.

QUEDNAU, B. D., NICOLL, D. A., PHILIPSON, K. D. Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. C1250 – C1261, 1997.

REIKEN, S., GABURJAKOVA, M., GUATIMOSIM, S., GOMEZ, A. M., D'ARMIENTO, J., BURKHOF, D., WANG, J., VASSORT, G., LEDERER, W.J., MARKS, A.R. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 444-453, 2003.

RIVAROLI, L. **Avaliação da função cardíaca do teleósteo neotropical matrinxã, *Brycon amazonicus*: uma análise mecânica e biomolecular** (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 104 f. 2011.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: Adaptação e meio ambiente**. Editora Santos. 2002, 611 p.

SCHMIDT-RHAESA, A. **The Evolution of Organ Systems**. Oxford University Press, NY. 2007. 385 p,

SCHULZE, D.H., KOFUJI, P, VALDIVIA, C., HE, S., LUO, S., RUKNUDIN, A., WISEL, S., KIRBY, M.S., duBELL, W., LEDERER, W.J. Alternative splicing of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger gene, NCX1. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 779, p. 46–57, 1996.

SCHWARZ, E., BENZER, S. Calx, a Na-Ca exchanger gene of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, pp. 10249-10254, 1997.

SECOR, S.M., STEIN, E.D., DIAMOND, J. Rapid up regulation of snake intestine in response to feeding: a new model of intestinal adaptation. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. G695-G705, 1994.

SECOR, S.M., DIAMOND, J. Adaptive responses to feeding in Burmese pythons: pay before pumping. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1313-1325, 1995.

SECOR, S.M., DIAMOND, J. Determinants of the post feeding metabolic response in Burmese pythons (*Python molurus*). **Physiological zoology**, v. 70, p. 202-212. 1997a.

SECOR, S.M., DIAMOND, J. Effects of meal size on postprandial responses in juvenile Burmese pythons (*Python molurus*). **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 902-912, 1997b.

SECOR, S.M., DIAMOND, J. A vertebrate model of extreme physiological regulation. **Nature**, 395, 659-662. 1998.

SECOR, S., M., HICKS, J.W., BENNETT, A.F. Ventilatory and cardiovascular responses of a python (*Python molurus*) to exercise and digestion. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 2447-2454, 2000.

SECOR, S.M. Regulation of digestive performance: a proposed adaptive response. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 128A, p. 565-577. 2001.

SECOR, S.M. Gastric function and its contribution to the postprandial metabolic response of the Burmese python *Python molurus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 1621-1630. 2003.

SECOR, S.M. Digestive physiology of the Burmese python: broad regulation of integrated performance. **The Journal of Experimental Biology**, v. 211, p. 3767-3774. 2008.

- SECOR, S. M. Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 179, p. 1–56, 2009.
- SEEHERMAN, H. J., TAYLOR, C. R., MALOIJ, G. M. O., ARMSTRONG, R. B. Design of the mammalian respiratory system. Measuring maximum aerobic capacity. **Respiration physiology**, v. 44, p. 11-23. 1981.
- SEYMOUR, R. S., BENNETT-STAMPER, C. L., JOHNSTON, S. D., CARRIER, D. R. & GRIGG, G. Evidence for endothermic ancestors of crocodiles at the stem of archosaur evolution. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, p. 1051-1067, 2004.
- SHWARZ, E.M., BENZER, S. Calx, a Na-Ca exchanger gene of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, pp. 10249-10254, 1997.
- SIMÕES-COSTA, M.S., VASCONCELOS, M., SAMPAIO, A.C., CRAVO, R.M., LINHARES, V.L., HOCHGREB, T., YAN, C.Y.I., DAVIDSON, B. XAVIER-NETO, J. The evolutionary origin of cardiac chambers. **Developmental Biology**, v. 277, p. 1-15, 2005.
- SIMMERMAN, H.K.B., JONES, L.R. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function, **Physiological Reviews**, v. 78, p.921-947, 1998.
- SIPIDO, K.R., VOLDERS, P.G.A., DE GROOT, S.H.M., VERDONCK, F., VAN DE WERF, F., WELLENS, H.J.J., VOS, M.A. Enhanced Ca²⁺ release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: Potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. **Circulation**. v. 102, p. 2137-2144, 2000.
- SLACK, J. P., GRUPP, I. L., LUO, W., KRANIAS, E. G. Phospholamban ablation enhances relaxation in the murine soleus. **American journal of physiology**, v. 273, C1 – C6, 1997.
- SOUTHERN, E.M. Detection of sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, p. 503-517, 1975.
- SRIVASTAVA, D., OLSON, N. E. A genetic blueprint for cardiac development. **Nature**, v. 407, p. 221-226, 2000.
- STARCK, J.M., BEESE, K. Structural flexibility of the intestine of Burmese python in response to feeding. **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 325-335. 2001.
- STARCK, J.M. **Structural flexibility of the digestive system of tetrapods. Patterns and processes on the level of cells and tissues.** In *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates* (ed. J. M. Starck and T.Wang), Enfield, NH: Science Publishers, 2005. P. 175-200.

STARCK, J.M., WIMMER, C. Patterns of blood flow during the postprandial response in ball python, *Python regius*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, 881-889. 2005.

STARCK, J.M., CRUZ-NETO, A.P., ABE, A.S.R. Physiological and morphological responses to feeding in broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 2033-2045. 2007.

STUDER R, REINECKE H, BILGER J, ESCHENHAGEN T, BOHM M, HASENFUSS G, JUST H, HOLTZ J, DREXLER H. Gene expression of the cardiac sodium-calcium exchanger in end-stage human heart failure. **Circulation Research**, v. 75, p. 443-453, 1994.

SUMMERS, A.P. Evolution: warm-hearted crocs. **Nature**, v. 434, p. 833-834, 2005.

SUAREZ, R. K. Hummingbird flight: sustaining the highest mass-specific metabolic rates among vertebrates. **Experientia**, v. 48, p. 565-570, 1992.

TAIGEN, T. L., WELLS, K. D., MARSH, R. L. The enzymatic basis of high metabolic rates in calling frogs. **Physiological zoology**, v. 58, p. 719-726, 1985.

TIBBITS, G.F., PHILIPSON, K.D., KASHIHARA, H. Characterization of myocardial Na⁺-Ca²⁺ exchange in rainbow trout. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. 411-417, 1992.

TIBBITS, G.F.; PHILIPSON, K.D.; KASHIHARA, H. Characterization of myocardial Na⁺-Ca²⁺ exchange in rainbow trout. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. 411-417, 1992b.

TIBBITS, G.F., HOVE-MADSEN, L., BERS, D.M. Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts: a comparison with higher vertebrates. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, p. 2014-2019, 1991.

TOYOFUKU T, ZAK R. Characterization of cDNA and genomic sequences encoding a chicken phospholamban. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 5375-5383, 1991.

TOYOFUKU, T., KURZYDLOWSKI, K., TADA, M., MACLENNAN, D.H. Amino acids Glu² to Ile¹⁸ in the cytoplasmic domain of phospholamban are essential for functional association with the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 3088-3094, 1994.

UETZ, P. How many reptiles species? **Herpetological Review**, v. 31, p. 13-15, 2000.

VERDADE, L.M., PIÑA, C.I. Caiman latirostris. **Catalog of the American Society of Amphibians and Reptiles**, Salt Lake, v. 833, p. 1-21, 2006.

VERDADE, L.M., SARKIS-GONÇALVES, F. Age at first reproduction in captive *Caiman latirostris* (Broad-snouted Caiman). **Herpetological Review**, Lawrence, v. 29, p. 227-228, 1998.

VERDADE, L.M. Manejo e conservação do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em São Paulo, Brasil. In: VALLADARES-PÁDUA, C.B., BODMER, R.E., CULLEN, L.J.R. (Ed.). **Manejo de vida silvestre para a conservação**. Mamirauá: Sociedade Civil Mamirauá, 1997. P. 222-232.

VETTER, R., STUDER, R., REINECKE, H., KOLÁR, F., OSTÁDALOVÁ, I, DREXLER, H. Reciprocal changes in the post natal expression of the sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} exchanger and SERCA2 in rat heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 27, p. 1689-1701, 1995.

VINEGAR, A., HUTCHISON, V. H., DOWLING, H. Metabolism, energetics, and thermoregulation during brooding of snakes of genus *Python* (Reptilia, Boidae). **Zoologica**, vol 55, p. 19-48, 1970.

VORNANEN, M. Effect of extracellular calcium on the contractility of warm- and cold-acclimated crucian carp heart. **Journal of Comparative Physiology**, v. 165, p. 507-517, 1996.

VORNANEN, M. Na^+ / Ca^{2+} exchange current in ventricular myocytes of fish heart: Contribution to sarcolemmal Ca^{2+} influx. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 1763-1775, 1999.

VORNANEN, M. Regulation of contractility of the fish (*Carassius carassius* L.) heart ventricle. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 94, p. 477-483, 1989.

WALKER, M.R., RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu Editora, 334p. 1999.

WALTON, M., JAYNE, B. C., BENNETT, A. F. The energetic cost of limbless locomotion. **Science**, v. 249, p. 524-527, 1990.

WEGENER, A. D., JONES, L. R. Phosphorylation-induced mobility shift in phospholamban in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 1834-1841, 1984.

WIER, W.G. Cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ in mammalian ventricle: Dynamic control by cellular processes. **Annual Review of Physiology**, v. 52, p. 467-485, 1990.

WILL, H., KUTTNER, I., KEMSIES, C., VETTER, R., SCHUBERT, E. Comparative analysis of phospholamban phosphorylation in crude membranes of vertebrate hearts. **Experientia**, v. 41, p. 1052-1054, 1984.

WILSON, E. O. **Biodiversidade**. Nova Fronteira S. A., Rio de Janeiro, Brasil. 1997, 658p.

WUYTACK, F., RAEYMACKERS, L., MISSIAEN, L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. **Cell Calcium**, v. 32, p. 279-305, 2002.

ZUG, G.R., VITT, L.J., CALDWELL, J.P. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. 2nd ed. 2001, 630p.

8. ANEXOS

Region 1: Position 1 to 372

Consensus:

1

MENAHTKTVEEVLGHFGVNESTGLSLEQVKLKERWGSNELPAEEGKTLELVLVIEQFEDLLVRILLLA
ACISFVLAWFEEGEETITAFVEPFVILLILVANAIIVGVWQERNAENAIEALKEYEPENGKVYRQDRKS
VQRIKAKDIVPGDIVEIAVGDKVPADIRLTSIKSTTLRVDQSILTGESVSVIKHTDPVDPRAVNQDK
KNMLFSGTNIAGKAMGVVATGVNTEIGKIRDEMVAEQERTPLQQKLEDFGEQLSKVISLICIAVW
IINIGHFNDFVHGGSWIRGAIYYFKIAVALAVAAIPEGLPAVITTCALGTRMAKKNNAIVRSLPSVE
TLGCTSVICSDKTGTLTTNQMSVCRMFIKDKV 372

Region 2: Position 397 to 537

Consensus:

397

KDDKPKVCHQYDGLVELATICALCNDSALDYNEAKGVYEVGEATETALTCLVEKMNVDTELKGLSK
IERANACNSVIKQLMKKEFTLEFSRDRKSMSVYCTPNKPSRTSMSKMFVKGAPGVIDRCTHIRVGST
KVPMT 537

Region 3: Position 539 to 569

Consensus:

539 GVKQKIMSVIREWGS SDTLRCLALATHDNP 569

Region 4: Position 579 to 643

Consensus:

579

DSANFIKYETNLTFVGCVMGLDPPRIEVASSVKLCRQAGIRVIMITGDNKGTAVAICRRIGIFGQ
643

Region 5: Position 668 to 712

Consensus:

668 ACLNARCFARVEPSHKSKIVEFLQSFDEITAMTGDGVNDAPALKK 712

Region 6: Position 714 to 864

Consensus:

714

EIGIAMSGTAVAKTASEMVLADNDFSTIVAAVEEGRAIYNNMKQFIRYLISNVGEVVCIFLTAALG
FPEALIPVQLLWVNLVTDGLPATALGFNPPDLDIMNKPPRNPKEPLISGWLFFRYLAIGCYVGAATVG
AAAWWFIAADGGPRV 864

Region 7: Position 866 to 882

Consensus:

866 FYQLSHFLQCKEDNPDF 882

Region 8: Position 890 to 962

Consensus:

890

FESPYPMTMALSVLVTIEMCNALNSLSENQSLLRMPWENIWLVGSI CLSMLHFLILYVEPLPLIFQ
ITPLN 962

Region 9: Position 964 to 992

Consensus:

964 TQWLMVLKISLPVILMDETLKFVARNYLE 992

Anexo 1a. Alinhamento da estrutura primária e regiões conservadas da SERCA2 entre os mamíferos *Oryctolagus cuniculus*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus*, e o *Mus musculus* utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Comprimento mínimo de 15 resíduos para a sequência completa. Entropia máxima por posição: 0.2.

Region 1: Position 115 to 129

Consensus:

115 AIEALKEYEPEMGKV 129

Region 2: Position 170 to 184

Consensus:

170 STTLRVDQSILTGES 184

Region 3: Position 195 to 219

Consensus:

195 PDPRAVNQDKKNMLFSGTNIAAGKA 219

Region 4: Position 300 to 368

Consensus:

300

VALAVAAIPEGLPAVITTCALGTRMAKKNNAIVRSLPSVETLGCTSVICSDKTGTLTTNQMVSVCRMFI 368

Region 5: Position 406 to 423

Consensus:

406 QYDGLVELATICALCND 423

Region 6: Position 433 to 457

Consensus:

433 VYEKVGEEATETALTCLVEKMNVFDT 457

Region 7: Position 484 to 500

Consensus:

484 TLEFSRDRKSMSVYCTP 500

Anexo 1b. Alinhamento da estrutura primária e regiões conservadas da SERCA2 entre o *Rattus norvegicus*, e o *Gallus gallus* utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Comprimento mínimo de 15 resíduos para a sequência completa. Entropia máxima por posição: 0.2.

Region 1: Position 55 to 84
Consensus:
55 EQFEDLLVRILLLAACISFVLAWFEEGEET 84

Region 2: Position 115 to 131
Consensus:
115 AIEALKEYEPEMGKVYR 131

Region 3: Position 170 to 191
Consensus:
170 STTLRVDQSILTGESVSVIKHT 191

Region 4: Position 194 to 219
Consensus:
194 VPDRAVNQDKKNMLFSGTNIAAGKA 219

Region 5: Position 247 to 268
Consensus:
247 TPLQOKLDEFGEQLSKVISLIC 268

Region 6: Position 274 to 292
Consensus:
274 INIGHFNDPVHGGSWIRGA 292

Region 7: Position 294 to 361
Consensus:
294
YYFKIAVALAVAAIPEGLPAVITTCALGTRRMAKKNAIVRSLPSVETLGCTSVICSDKTGTLTTNQM
361

Region 8: Position 408 to 423
Consensus:
408 DGLVELATICALCNDS 423

Region 9: Position 483 to 498
Consensus:
483 FTLEFSRDRKSM SVYC 498

Anexo 1c. Alinhamento da estrutura primária e regiões conservadas da SERCA2 entre o *Rattus norvegicus* e o *Danio rerio* utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Comprimento mínimo de 15 resíduos para a sequência completa. Entropia máxima por posição: 0.2.

1 conserved regions found

Region 1: Position 3 to 50
Consensus:
3 KVQYLTRSAIRRASTIEMPQQARQNLQNLFINFCLILICLLLICIIVM 50

Anexo 2a. Alinhamento da estrutura primária e regiões conservadas do PLB entre os mamíferos *Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Sus scrofa*, , e o *Mus musculus* utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Comprimento mínimo de 15 resíduos para a sequência completa. Entropia máxima por posição: 0.2.

1 conserved regions found

Region 1: Position 34 to 50

Consensus:

34 NFCLILICLLLCIIVM 50

Anexo 2b. Alinhamento da estrutura primária e regiões conservadas do PLB entre o *Rattus norvegicus* e o *Gallus gallus* utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Comprimento mínimo de 15 resíduos para a sequência completa. Entropia máxima por posição: 0.2.

Region 1: Position 45 to 221 Consensus:
45
ECTGSYYCKKGVILPIWEPQDPSFGDKIARATVYFVAMVYMFLGVSIIADRFMSSIEVITSQEKEITI
KKPNGETTKTTVRIWNETVSNLTLMALGSSAPEILLVSVIEVCGHNFTAGDLGPSTIVGSAAFNMFI
ALCVYVVPDGETRRIKHLRVFFVTAAWSIFAYTWLYIILSV 221

Region 2: Position 223 to 280 Consensus:
223 SPGVVEVWEGLLTFPPICVVFVAVADRLLFYKYVYKRYRAGKQGMIIIEHEDRP 280

Region 3: Position 282 to 297 Consensus:
282 SKTEIEMDGKVVNSHV 297

Region 4: Position 300 to 335 Consensus:
300 FLDGALVLEVDERDQDDEEARREMARILKELKQKHP 335

Region 5: Position 337 to 394 Consensus:
337 KEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRLMTGAGNILKRHAADQARKAVSMHEVN 394

Region 6: Position 407 to 426 Consensus:
407 FFEQGTQCLENCGTVALTI 426

Region 7: Position 436 to 461 Consensus:
436 TVFVDFRTEDGTANAGSDYEFTEGTV 461

Region 8: Position 463 to 495 Consensus:
463 FKPGETQKEIRVGIIDDDIFEEDENFLVHLSNV 495

Region 9: Position 527 to 568 Consensus:
527 TIFDDDHAGIFTFEEPVTHVSESIGIMEVKVLRRTSGARGNVI 568

Region 10: Position 570 to 620 Consensus:
570 PYKTIEGTARGGGEDFEDTCGELEFQNDIVKTIKVIDDEEYEKNKTFF 620

Region 11: Position 622 to 646 Consensus:
622 EIGEPRLVEMSEKKALLLNELGGFT 646

Region 12: Position 678 to 697 Consensus:
678 EYDDKQPLTSKEEEEERRIAE 697

Region 13: Position 709 to 822 Consensus:
709
LEVIIEESYEFKSTVDKLIKKTNLALVVGTSNSWREQFIEAITVSAGEDDDDDDECGEKLPSCFDYVMH
FLTVFVKVLFVFPTEYWNGWACFIVSILMIGLLTAFIGDLASHF 822

Region 14: Position 828 to 945 Consensus:
828
LKDSVTAVVFVALGTSVPDTFASKVAATQDQYADASIGNVTGSNAVNVFLGIGVAWSIAAIYHAANGE
QFKVSPGTLAFSVTLFTIFAFINVGVLRYRRRPEIGGELGGPRTAKLLTS 945

Region 15: Position 947 to 970 Consensus:
947 LFVLLWLLYIFFSSLEAYCHIKGF 970

Anexo 3a. Alinhamento da estrutura primária e regiões conservadas do NCX1 entre o *Rattus norvegicus*, *Cavia porcellus*, *Mus musculus* e *Bos taurus* utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Comprimento mínimo de 15 resíduos para a sequência completa. Entropia máxima por posição: 0.2.

Region 1: Position 52 to 107

Consensus:

52 CKKGVILPIWEPQDPSFGDKIARATVYFVAMVYMFLGVSIIADRFMSSIEVITSQE 107

Region 2: Position 121 to 156

Consensus:

121 KTTVRIWNETVSNLTLMALGSSAPEILLSVIEVCGH 156

Region 3: Position 158 to 177

Consensus:

158 FTAGDLGPSTIVGSAAFNMF 177

Region 4: Position 193 to 225

Consensus:

193 RKIKHLRVFFVTAAWSIFAYTWLYIILSVSSPG 225

Region 5: Position 227 to 247

Consensus:

227 VEVWEGLLTFFFFPICVVF 247

Region 6: Position 263 to 280

Consensus:

263 YRAGKQRGMIIEHEGDRP 280

Region 7: Position 313 to 394

Consensus:

313

DQDDEEARREMARILKELKQKHPDKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRLMTGAGNILKRHA
ADQARKAVSMHEVN 394

Region 8: Position 408 to 437

Consensus:

408 FEQGTYQCLENCGTVALTIIRGGDLTNTV 437

Region 9: Position 439 to 461

Consensus:

439 VDFRTEDGTANAGSDYEFTEGTV 461

Region 10: Position 463 to 498

Consensus:

463 FKPGETQKEIRVGIIDDDIFEEDENFLVHLSNVRVS 498

Anexo 3b. Alinhamento da estrutura primária e regiões conservadas do NCX1 entre o *Rattus norvegicus* e o *Gallus gallus* utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Comprimento mínimo de 15 resíduos para a sequência completa. Entropia máxima por posição: 0.2.

1 conserved regions found

Region 1: Position 708 to 734

Consensus:

708 KLEVIIEESYEFKSTVDKLIKKTNLAL 734

Anexo 3c. Alinhamento da estrutura primária e regiões conservadas do NCX1 entre o *Rattus norvegicus* e o *Danio rerio* utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Comprimento mínimo de 15 resíduos para a sequência completa. Entropia máxima por posição: 0.2.