

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

**EFEITOS DA TEMPERATURA E MANEJO DO CÁLCIO SOBRE O MIOCÁRDIO  
VENTRICULAR DO TELEOSTEO NEOTROPICAL *Prochilodus lineatus***

**TELMA APARECIDA COSTA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência - Área de concentração em fisiologia.

**São Carlos – SP**  
**2005**

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

C837et

Costa, Telma Aparecida.

Efeitos da temperatura e manejo do cálcio sobre o miocárdio ventricular do teleosteo neotropical *Prochilodus lineatus* / Telma Aparecida Costa. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

90 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Fisiologia comparada. 2. Curimatá (Peixe). 3. Miocárdio ventricular. 4. Temperatura. 5. Eletrocardiograma. 6. Acoplamento E-C. I. Título.

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

**ORIENTADORA**

---

**Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin**

*Ao meu filho Robson, motivo de todas as minhas conquistas, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Romildo e Dulce por apoiarem minhas escolhas.

À querida Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin, exemplo de dedicação e competência, pela orientação e especialmente, pelo carinho e paciência dedicados a mim, durante todo o trabalho.

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

Ao corpo docente e funcionários do departamento de Ciências Fisiológicas em especial ao Sr. Nelson A. Matos (*in memoriam*) e ao José Roberto.

A UNIPAR pelo apoio financeiro.

A todos os professores e funcionários da UNIPAR, que sempre me auxiliaram, o que permitiu minhas viagens. Em especial aos Professores: Décio Roberto Calegari coordenador do Curso de Educação Física e Eliani Fausti coordenadora do curso de Nutrição e todo vosso corpo docente, pessoas que muito admiro.

Aos amigos Matheus, Mônica e Cláudio, pela fundamental contribuição desde de o início dos experimentos.

A Cristine pelo valioso auxílio na condução dos experimentos.

Aos amigos que sempre me acolheram em suas casas durante todo o curso em especial à Karina, Lenise, Fernanda, Jane, e ao Fabinho.

A todos os colegas do laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa, pelo agradável convívio.

Ao meu companheiro Henry, pelo amor, paciência e incentivo sem os quais esse trabalho não teria se realizado.

Ao meu filho Robson pela compreensão em muitos momentos em que foi privado da minha companhia devido as minhas longas e intermináveis viagens.

Aos meus irmãos Luciane, Luiz Henrique e Anelise, ao meu cunhado Edson e sobrinhas Raphaela e Luiza pelo carinho e confiança que deram maior valor a esse trabalho.

Ao Sr. Massami e Sra. Yukiko meus segundos pais e demais familiares, César, Marta, Yughi e Rafael pelo carinho.

As queridas amigas Carol e Mara pelo companheirismo.

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

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRAT.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Manejo do cálcio no músculo cardíaco .....	1
1.2. Objetivos.....	8
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>9</b>
2.1. Posição Sistemática da Espécie .....	9
2.2. Breves Considerações Sobre a Espécie Estudada.....	9
2.3. Coleta e Manutenção em Laboratório .....	11
2.4. Preparações Experimentais.....	11
2.4.1. Experimentos <i>in vivo</i> .....	11
2.4.2.1. Protocolos Experimentais .....	15
a) Efeito da Temperatura .....	15
b) Efeito do Aumento da Concentração de Cálcio .....	15
c) Efeito da Adrenalina.....	15
d) Tensão Pós-Pausa.....	16
e) Relação Força-Freqüência.....	17
2.4.3. Análise dos Resultados.....	17
2.1.1.1. Tratamento Estatístico dos Dados .....	19
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
3.1. Freqüência Cardíaca <i>In Vivo</i> .....	20
<b>Temperatura .....</b>	<b>21</b>
3.2. Anéis ventriculares. ....	22
3.2.1. Efeito da elevação da temperatura.....	22
3.2.1.1. Força de Contração (Fc).....	22
3.2.1.2. Tempos de Contração e Relaxamento Cardíacos (TPT e THR).....	22
3.2.2. Efeito da Elevação na Concentração de Cálcio Extracelular .....	25
3.2.2.1. Força de Contração (Fc).....	25
3.2.2.2. Tempos de Contração e Relaxamento Cardíacos (TPT e THR).....	25
3.2.3. Efeito da adrenalina .....	28
3.2.3.1. Força de Contração (Fc).....	28
3.2.3.2. Tempos de Contração e Relaxamento Cardíacos (TPT e THR).....	28
3.2.4. Tensão Pós - Repouso .....	31
3.2.5. Efeito do Aumento na Freqüência de Estimulação .....	33
a) 25° C - Controle versus 25° C – Rianodina.....	33
b) 35° C - Controle versus 35° C – Rianodina .....	35
c) 25° C versus 35° C .....	37

d) 25° C versus 35° C – Rianodina.....	37
3.2.5.7. Tensão de Repouso.....	41
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
4.1. Frequência cardíaca <i>in vivo</i> .....	44
4.2. Músculo cardíaco isolado.....	48
4.2.1. Efeito da elevação da temperatura sobre a força de contração e parâmetros tempo-dependentes.....	48
4.2.2. Efeito da elevação na concentração de cálcio extracelular sobre o desenvolvimento de força e parâmetros tempo-dependentes a 25° C e 35° C.....	54
4.2.3. Efeito da adição de adrenalina sobre a força de contração e parâmetros tempo-dependentes a 25° C e 35° C.....	59
4.2.4. Tensão pós-repouso.....	64
4.2.5. Efeito do aumento na frequência de estimulação.....	69
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores de frequência cardíaca ( $f_H$ – bpm) <i>in vivo</i> de curimatá, em resposta à elevação de temperatura de 25° C para 35° C e retorno subsequente para 25° C (n = 10). Valores médios $\pm$ E.P.M. ....	21
TABELA 2. Valores da força de contração ( $F_c$ – % dos valores iniciais), do tempo para o pico de força (TPT – ms) e do tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvidos pelos anéis ventriculares de curimatá (n = 10) durante a elevação da temperatura de 25° C para 35° C e no retorno subsequente para 25 °C. Valores médios $\pm$ E.P.M. ....	23
TABELA 3. Valores da força de contração ( $F_c$ - % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá (n = 8) durante a elevação gradual da concentração de $Ca^{2+}$ no meio extracelular ( $[Ca^{2+}]_e$ - mM) nas temperaturas de 25°C e 35° C. Valores médios $\pm$ E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os valores obtidos a 25° C e 35° C ( $p < 0,05$ ). ....	26
TABELA 4. Valores do tempo para o pico de tensão (TPT – ms) e do tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) de curimatá (n = 10) durante a elevação gradual da concentração de $Ca^{2+}$ no meio extracelular ( $[Ca^{2+}]_e$ - mM) nas temperaturas de 25°C e 35° C. Valores médios $\pm$ E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os valores obtidos a 25° C e 35° C ( $p < 0,05$ ). ....	27
TABELA 5. Valores da força de contração ( $F_c$ - % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá (n = 9) durante a elevação gradual da concentração de adrenalina (M) no meio extracelular nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios $\pm$ E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os valores obtidos a 25° C e 35° C numa mesma concentração de adrenalina ( $p < 0,05$ ). ....	29
TABELA 6. Valores da força de contração ( $F_c$ - % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá (n = 9) durante a elevação gradual da concentração de adrenalina (M) nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios $\pm$ E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os valores obtidos a 25° C e 35° C numa mesma concentração de adrenalina ( $p < 0,05$ ). ....	30
TABELA 7. Força desenvolvida na primeira contração ( $F_c$ - % da força desenvolvida na última contração precedente ao repouso) após 5 minutos de pausa diastólica pelos anéis ventriculares de curimatá sobre diferentes temperaturas em preparações controle (n = 10) e tratadas com 10 $\mu$ M de rianodina (n = 10). Os valores são médias $\pm$ E.P.M. ....	32
TABELA 8. Valores da força de contração ( $F_c$ – % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá, em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações controle (n = 10) e após tratamento com 10 $\mu$ M de rianodina (n = 10), na temperatura de 25° C. Valores médios $\pm$ E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação aos valores controle ( $p < 0,05$ ). ....	34
TABELA 9. Valores da força de contração ( $F_c$ – % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá, em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações controle e após tratamento com 10 $\mu$ M de rianodina (n = 10), na temperatura de 35° C. Valores médios $\pm$ E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação aos valores controle ( $p < 0,05$ ). ....	36

TABELA 10. Valores da força de contração (Fc – % dos valores iniciais das preparações controle a 25° C) dos anéis ventriculares de curimatá, em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações controle (n = 10) e após tratamento com 10 µM de rianodina (n = 10), nas temperaturas de 25° C e 35°C. Valores médios ± E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os valores obtidos a 25° C e 35° C numa mesma frequência (p < 0,05).....	39
TABELA 11. Valores da tensão de repouso (RT – % dos valores iniciais) das anéis ventriculares de curimatá, em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações controle (n = 10) e após tratamento com 10 µM de rianodina (n = 10), nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios ± E.P.M.....	42

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema geral do mecanismo de acoplamento excitação – contração E-C do músculo cardíaco, comparando um modelo existente para mamíferos (A) com um proposto para teleósteos (B) (Modificado de Tibbits et al., 1992)	7
FIGURA 2. Curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i> (Fish base)	11
FIGURA 3. Esquema demonstrado a preparação dos animais para a eletrocardiografia	122
FIGURA 4. Esquema do registro de força de contração isométrica antes e depois de uma pausa diastólica prolongada, mostrando a potenciação da mesma.	165
FIGURA 5. Esquema mostrando as variáveis medidas no registro de força de contração isométrica no presente estudo. Fc: Força de contração; TPT: Tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: Tempo necessário para que ocorra 50 % do relaxamento.	198
FIGURA 6. Efeito da elevação gradual da temperatura de 25° C para 35° C e do retorno subsequente para 25° C sobre a frequência cardíaca <i>in vivo</i> ( $f_H$ – bpm) de curimatá (n = 10). Valores médios $\pm$ E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).	210
FIGURA 7. Efeito da elevação da temperatura de 25° C para 35° C e do retorno subsequente para 25° C sobre a força de contração (Fc – % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá (n = 10). Valores médios $\pm$ E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).	232
FIGURA 8. Efeito da elevação da temperatura de 25° C para 35° C e do retorno subsequente para 25° C sobre o tempo para o pico de força (TPT – ms) e o tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvidos por anéis ventriculares de curimatá (n = 10). Valores médios $\pm$ E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).	243
FIGURA 9. Efeito de aumentos na concentração extracelular de cálcio ( $[Ca^{2+}]_e$ - mM) sobre o desenvolvimento de força de contração (Fc - % dos valores iniciais) dos anéis ventriculares de curimatá (n = 8) nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios $\pm$ E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).	265
FIGURA 10. Efeito de aumentos na concentração extracelular de cálcio ( $[Ca^{2+}]_e$ - mM) sobre o tempo para o pico de tensão (TPT – ms) e do tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) de anéis ventriculares de curimatá (n = 10) nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios $\pm$ E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).	276
FIGURA 11. Efeito de aumentos na concentração extracelular de adrenalina (M) sobre o desenvolvimento de força de contração (Fc - % dos valores iniciais) de anéis ventriculares de curimatá (n = 9) nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios $\pm$ E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).	28
FIGURA 12. Efeito de aumentos na concentração extracelular de adrenalina (M) sobre o tempo para o pico de tensão (TPT – ms) e do tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) dos anéis ventriculares de curimatá (n = 9) nas temperaturas de 25 e 35 °C. Valores médios $\pm$ E.P.M.	2930
FIGURA 13. Efeito da temperatura sobre a tensão pós-pausa (Fc - % da força desenvolvida na última contração precedente ao repouso) dos anéis ventriculares de curimatá após uma pausa em preparações controle e tratadas com 10 $\mu$ M de	

rianodina. Uma frequência de estimulação de 0,2 Hz foi seguida por uma pausa diastólica de 5 min. As barras verticais representam valores médios $\pm$ E.P.M. Asteriscos acima das barras = diferença significativa em relação aos valores pré-pausa ( $p < 0.05$ ). Sinais de mais acima das linhas horizontais = diferença significativa entre os valores controle e após adição de rianodina ( $p < 0.05$ ).....	321
FIGURA 14. Efeito de aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) sobre a força de contração ( $F_c$ – % dos valores iniciais) dos anéis ventriculares de curimatá, em preparações controle ( $n = 10$ ) e após tratamento com $10 \mu\text{M}$ de rianodina ( $n = 10$ ), na temperatura de $25^\circ\text{C}$ . Valores médios $\pm$ E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....	343
FIGURA 15. Efeito de aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) sobre a força de contração ( $F_c$ – % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá, em preparações controle e após tratamento com $10 \mu\text{M}$ de rianodina ( $n = 10$ ), na temperatura de $35^\circ\text{C}$ . Valores médios $\pm$ E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....	365
FIGURA 16. Efeito da temperatura sobre a força de contração ( $F_c$ – % dos valores iniciais) dos anéis ventriculares de curimatá, em preparações controle ( $n = 10$ ) durante aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz). Valores médios $\pm$ E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....	39
FIGURA 17. Efeito da temperatura sobre a força de contração ( $F_c$ – % dos valores iniciais) dos anéis ventriculares de curimatá, em preparações tratadas com $10 \mu\text{M}$ de rianodina ( $n = 10$ ) durante aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz). Valores médios $\pm$ E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....	3940
FIGURA 18. Efeito de aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) sobre a tensão de repouso ( $RT$ – % dos valores de força a $0,2\text{ Hz}$ ) dos anéis ventriculares de curimatá, em preparações controle ( $n = 10$ ) e após tratamento com $10 \mu\text{M}$ de rianodina ( $n = 10$ ), nas temperaturas de $25^\circ\text{C}$ e $35^\circ\text{C}$ . Valores médios $\pm$ E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).....	421
FIGURA 19: Efeito da elevação da temperatura sobre o potencial de ação dos miócitos ventriculares de truta (COYNE et al., 2000).....	465
FIGURA 20. Esquema demonstrando os mecanismos que promovem a entrada de $\text{Ca}^{2+}$ e sua extrusão do citosol em miócitos ventriculares (adaptada de BERS, 2002).....	4849
FIGURA 21. Esquema demonstrando o efeito da adrenalina sobre os mecanismos transportadores de $\text{Ca}^{2+}$ no miócito cardíaco. AC – adenilato ciclase; NCX – trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; PKA – proteína-quinase A; PLB - fosfolambano; RS – retículo sarcoplasmático; RyR – receptor de rianodina; $\text{SERCA}_2$ – $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endo-sarco-plasmático.....	610

## RESUMO

O presente estudo teve por objetivo analisar as respostas *in vivo* (frequência cardíaca) e *in vitro* (Força – Fc) do miocárdio ventricular de curimatá, *Prochilodus lineatus*, aclimatados a 25° C e testados a 25 e 35° C. Os registros de frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) após elevação gradual da temperatura, e seu retorno subsequente a 25° C, foram feitos através de implantes de eletrodos de ECG na região cardíaca. Adicionalmente foram feitos registros das respostas inotrópicas (Fc – %) e dos parâmetros tempo-dependentes (TPT – tempo para o pico de força e THR – tempo para 50% do relaxamento) de anéis ventriculares estimulados eletricamente a diferentes frequências em função da temperatura, concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ , adrenalina e rianodina (bloqueadora da função do retículo sacoplasmático – RS). *In vivo*, o aumento da temperatura elevou a  $f_H$  de 49 bpm a 25° C para 115 bpm a 35° C, recuperando os valores iniciais com o retorno a 25° C. A elevação da temperatura desencadeou inotropismo negativo, sendo que o TPT e o THR variaram de maneira inversa a temperatura. A adição de concentrações crescentes  $Ca^{2+}$  (de 1,25 até 11,25 mM) ao banho causou aumento da Fc, demonstrando a importância do  $Ca^{2+}$  extracelular. A 25° C, tanto o TPT quanto o THR foram prolongados em função das elevações nas concentrações de  $Ca^{2+}$  enquanto que a 35° C, apenas o TPT aumentou. A adição de adrenalina só causou efeito inotrópico positivo a 35° C, sendo que os parâmetros tempo-dependentes não sofreram alterações em nenhuma das temperaturas experimentais. A análise da tensão pós-pausa, com e sem 10  $\mu$ M de rianodina, revelou uma significativa potenciação da força tanto a 25 quanto a 35° C, sendo esta abolida pela rianodina. Com o aumento da frequência de estimulação, observou-se redução progressiva na Fc e significativo aumento da tensão de repouso (RT). O tratamento com rianodina provocou uma diminuição na Fc independente da temperatura. Os resultados revelaram que o  $Ca^{2+}$  responsável pela ativação dos miofilamentos deve derivar de pelo menos duas fontes: os espaços extracelulares (evidenciado pelo aumento de Fc durante incrementos na concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular) e uma fração significativa fornecida por fontes internas, ou seja, o RS.

## ABSTRACT

The present study analyzed the *in vivo* and *in vitro* responses of the myocardium obtained from *Prochilodus lineatus* acclimated at 25 °C and tested at 25 and 35 °C. The *in vivo* heart rate ( $f_H$  – bpm) was measured during acute transitions in temperature and subsequent return to 25° C. ECG recordings (lead D<sub>1</sub> of the electrocardiography) were obtained of electrodes at cardiac region. Recordings of the isometric contraction force (Fc – %) and time-dependent parameters (TPT – time to peak tension; THR – time to half relaxation) were obtained *in vitro* from ventricle rings electrically paced in response to stimulation frequency, temperature, extracellular Ca<sup>2+</sup>, adrenaline and ryanodine (blocker of the sarcoplasmic reticulum – SR). The species showed a significant increase in the  $f_H$  during the transition from 25 to 35° C, showing the importance of the chronotropic adjustments in response to thermal alterations and a great tolerance and adaptation to different thermal conditions. The species did show significant decreases in the twitch force (Fc) development by the ventricular strips during the increases of temperature. The addition of crescent Ca<sup>2+</sup> concentrations to the medium evidenced the importance of the extracellular Ca<sup>2+</sup> as showed by the Fc increases at both 25 and 35° C. Concomitant increases in in TPT and THR here recorded at 25 °C while at 35° C, such increases were observed only in TPT. Adrenaline caused positive inotropism only at 35° C, without effect on time-dependent parameters. The post rest tension was conducted with and without 10 µM ryanodine in the medium. A significant post rest potentiation was recorded for at 25 and 35° C These post rest potentiations were inhibited by ryanodine. The impact of increases in the imposed contraction frequency caused a decline of the force and an increase in resting tension (RT) at both temperatures. In conclusion, an important fraction of the activator Ca<sup>2+</sup> in *P. lineatus* seems to derive from intracellular stores (RS). However, this species also depends on extracellular sources of Ca<sup>2+</sup>, which provide more flexibility to modulate the contraction force.

## 1. INTRODUÇÃO

Os peixes, que representam 48% das espécies conhecidas do subfilo Vertebrata (Autman & Dittmer, 1972 *apud* BOLIS et al., 2001), habitam os ambientes mais adversos, desde as águas salgadas e geladas dos mares polares até as águas doces e quentes dos trópicos. Além disso, estão sujeitos a grandes variações no ambiente em que vivem, especialmente na temperatura, a qual sofre mudanças sazonais. As mudanças na temperatura também podem ser mais rápidas, resultantes do ciclo circadiano (MATTHEWS & BERG, 1997) ou da movimentação dos peixes através da coluna d'água em busca de alimento, para fugir de predadores ou ainda para se reproduzirem (REID et al., 1997). Para adaptarem-se a estas variações, os peixes ajustam seus mecanismos bioquímicos e fisiológicos de uma maneira compensatória. No sistema cardiovascular, tanto as respostas cronotrópicas quanto inotrópicas são alteradas em função das variações térmicas.

### 1.1. Manejo do cálcio no músculo cardíaco

Denomina-se acoplamento excitação-contração à seqüência de eventos que ocorrem desde a despolarização, até a contração do miócito cardíaco. Esse processo é regulado pela concentração dos íons ( $\text{Ca}^{2+}$ ) livre no citoplasma.

A manutenção da homeostase dos íons cálcio é importante para o controle do acoplamento excitação-contração, uma vez que o cálcio é um mensageiro intracelular essencial ao sistema cardiovascular. Essa homeostase é regulada por dois ciclos: o ciclo externo, que controla a entrada e a remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  entre o citosol e o meio extracelular, e um ciclo intracelular, que é responsável pelo controle do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  entre o citosol e seus estoques no retículo sarcoplasmático (KATZ, 1997). O retículo sarcoplasmático (RS) é uma organela especializada no acúmulo e liberação  $\text{Ca}^{2+}$  ao aparato contrátil (BERS, 1991).

Segundo BERS (2000), há uma diferença interespecífica entre a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador provindo dessas duas fontes. Em coelhos, 77% do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador provêm do RS e 23 % do meio extracelular em cada contração enquanto que em ratos, 92 % do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador, provêm do RS e apenas 8 % do meio extracelular, em concordância com o exposto anteriormente para os mecanismos de remoção deste íon do citoplasma. Em

contraste, em anfíbios, o meio extracelular é a principal fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  ao aparato contrátil (BERS, 2002; BERS et al., 1993).

O fluxo de cálcio é mediado por algumas famílias de proteínas, incluindo aquelas que regulam sua entrada, as que o reconhecem e aquelas que retiram o  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol (KATZ, 1997).

Tanto em mamíferos quanto em peixes, a entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular envolvido na ativação da contração muscular cardíaca dá-se principalmente através de canais do tipo L (canais lentos) da sarcolema. Secundariamente, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) também pode participar do processo, trabalhando em seu modo reverso, este fato foi observado por BAARTSCHEER et al. (1996) em miócitos ventriculares de ratos. Entretanto, apesar da magnitude do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema variar entre diferentes espécies, já é bem estabelecido que em mamíferos a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  que adentra o miócito por esta via não é suficiente para suportar a contração muscular (BERS et al., 1993).

Nos mamíferos, os canais L são abundantes nos túbulos transversos (túbulos T) e, ao estabelecerem conexão estrutural direta com o RS - mecanismo de controle local descrito por STERN (1992) - os canais L pulverizam os receptores de rianodina aí alojados com  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do meio extracelular ("spark" ou "fagulha" de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Esse processo estimula a liberação de grandes quantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS para o citosol, mecanismo este conhecido como liberação  $\text{Ca}^{2+}$  cálcio-induzida (FABIATO, 1983). Portanto, o  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do RS é o principal responsável pela contração muscular no músculo cardíaco de mamíferos (BHOGAL & COLYER, 1998).

A importância da sinalização dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  tem sido evidenciada há décadas e já é bem aceito que as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  são aumentadas em cerca de 10 vezes em relação aos seus valores de repouso durante a sístole. Presumivelmente, defeitos na sinalização, responsável pelo controle da diminuição ou elevação da concentração efetiva de  $\text{Ca}^{2+}$ , podem prejudicar a contratilidade e inclusive levar à falência cardíaca (MARKS, 2003).

Embora haja um grande volume de dados disponíveis na literatura sobre a regulação e manutenção do processo de acoplamento excitação-contração em mamíferos, os estudos em peixes, incluindo aqueles com abordagem em nível celular e/ou molecular, ainda estão limitados a um número muito reduzido de espécies (BLATTER et al., 1997; FAY & POPPER, 2000; TIBBITS et al., 2002; VORNANEN et al., 2002).

Diferentemente dos mamíferos, os peixes apresentam um RS pouco desenvolvido (AHO & VORNANEN, 1998) e sua real contribuição para o fornecimento de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador carece de mais estudos. Esta variabilidade pode ser atribuída, em parte, devido à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais do RS ser temperatura-dependente e por existirem diferenças interespecíficas na sensibilidade a rianodina do músculo cardíaco de ectotérmicos (SHIELS et al., 1999).

Em muitos estudos realizados com peixes, a contração muscular mostrou-se relativamente insensível a rianodina, evidenciando um RS não funcional (KEEN et al., 1994; RANTIN et al., 1998; COSTA et al., 2000). Conseqüentemente, os peixes dependem de um amplo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via sarcolema para o acoplamento excitação-contracção. Apesar de os canais L medirem a maior parte do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , segundo VORNANEN (1999), quando estes canais foram bloqueados utilizando bloqueador específico, a força desenvolvida pelo músculo da carpa-cruciana não foi totalmente abolida, sugerindo a participação do NCX para manter a contração muscular. Estudos estimam que a troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  pode contribuir com 30 a 50% do influxo total de  $\text{Ca}^{2+}$  via sarcolema. Essa atividade reversa do trocador promovendo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  foi descrita há décadas por Mullins, 1979 *apud* VORNANEN (1999).

De acordo com TIBBITS et al. (1992), a importância relativa do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da sarcolema também pode ser indicada pela presença de um longo potencial de ação, com uma fase de platô mais pronunciada. Isso pôde ser observado nas investigações realizadas por VORNANEN (1989) com carpa-cruciana.

O fato do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular provavelmente manter o acoplamento excitação-contracção em peixes teleósteos, bem como em outros vertebrados menos evoluídos, está diretamente relacionado aos aspectos morfológicos e estruturais apresentados pelos miócitos cardíacos.

De acordo com FARRELL & JONES (1992), a maioria dos teleósteos apresenta miócitos com diâmetro entre 2,5 e 6,0  $\mu\text{m}$ , variando desde 1,0 a 12,5  $\mu\text{m}$ , enquanto nos mamíferos estes estão entre 10 e 25  $\mu\text{m}$  (KEEN, et al., 1992). Além do tamanho reduzido, os miócitos cardíacos dos teleósteos são longos e estreitos em comparação com as dos mamíferos, (VORNANEN et al., 2002), possuindo de 4 a 5 vezes mais área de superfície sarcolemal por unidade de volume da célula. Suas miofibrilas estão arranjadas periféricamente, o que facilita muito as trocas entre os espaços intra e extracelulares (DRIEDZIC & GESSER, 1994), o que pode ser observado na figura 1.

Apesar de a maioria dos estudos demonstrarem que o influxo transsarcolemal é a principal fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador do processo contrátil em peixes e experimentos realizados com animais de ambientes temperados evidenciarem que o RS é funcional somente em algumas situações tais como: em frequências sub-fisiológicas e temperaturas supra-fisiológicas (SHIELS et al., 1999; COSTA et al., 2004), existem diferenças espécies-específicas proeminentes no processo acoplamento excitação-contracção e no papel relativo das fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  intra e extracelulares nas diferentes espécies (VORNANEN et al., 2002). Em algumas espécies de peixes, tais como nos atuns (VORNANEN et al., 2002) e no “burbot” (TIITU & VORNANEN, 2001), o RS de miócitos, sob determinadas circunstâncias, pode representar a maior fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  sistólico. Estas diferenças interespecíficas são obviamente uma estratégia evolutiva para adaptação a diferentes habitats e estilos de vida.

Existem também diferenças interespecíficas na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  cálcio-induzida, dependendo das mudanças crônicas ou agudas da temperatura.

De acordo com ANELLI-JR et al. (2004), o RS do teleósteo neotropical pacu (*Piaractus mesopotamicus*) pode contribuir como fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  para o processo acoplamento excitação-contracção mesmo em temperaturas fisiológicas para a espécie (25° C). Assim, pode-se evidenciar que o processo de acoplamento excitação-contracção não é um sistema estático, mas altamente versátil e maleável, o que permite aos peixes terem uma performance cardíaca apropriada para explorar uma diversidade de ambientes e, conseqüentemente, adaptar-se a modificações ambientais (VORNANEN et al., 2002).

A contratilidade cardíaca pode ser afetada grandemente por mudanças agudas na temperatura, que promovem alterações na condutância dos canais iônicos. Aumentos na temperatura promovem aumentos na frequência cardíaca e na velocidade de contracção, enquanto a força de contracção é usualmente diminuída. Como conseqüência, a capacidade de bombeamento, que é produto da força de contracção pela frequência cardíaca, pode sofrer uma redução desproporcional em teleósteos submetidos a temperaturas extremas (VORNANEN et al., 2002), o que poderia limitar o débito cardíaco (SHIELS et al. 2002).

Elevações agudas na temperatura ou hipóxia também desencadeiam nos peixes respostas típicas de estresse. Sob tais condições, os peixes liberam catecolaminas, que podem afetar profundamente o processo de acoplamento excitação-contracção. A adrenalina promove fosforilação dos canais L via ativação de uma proteína quinase A

(PKA), o que por sua vez aumenta a condutância desses canais e, conseqüentemente, a disponibilidade desse íon ao aparato contrátil (FABBRI et al., 1998).

Alguns estudos demonstraram que, em mamíferos, a adrenalina pode modificar o funcionamento do RS devido a PKA (proteína quinase A) fosforilar o fosfolambano, uma proteína que modula o funcionamento da SERCA ("sarco-endo-plasmic reticulum calcium ATPase") e os próprios canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (canais de rianodina) (BOLLER & POTT, 1989; MAcLENNEAN & KRANIAS, 2003). Dessa forma, os efeitos da adrenalina repercutem diretamente no desenvolvimento de força e na dinâmica da contração.

O desenvolvimento de força também é modificado por incrementos na frequência de estimulação. Em algumas espécies de mamíferos, como ratos, esses aumentos promovem concomitante aumento no pico de tensão, mecanismo conhecido como relação força-frequência positiva. O maior desenvolvimento de força em elevadas frequências está relacionado com a presença de um RS funcional e trocadores sarcolemais extremamente eficientes (LAYLAND & KENTISH, 1999).

Nos peixes, incrementos na frequência de estimulação, como observado durante exposição a elevadas temperaturas, geralmente culminam com a diminuição na força de contração na maioria das espécies de teleósteos estudadas. De acordo com DRIEDZIC & GESSER (1985), a relação força-frequência negativa apresentada por estes animais reflete indiretamente a ineficácia do acoplamento excitação-contração, evidenciando uma menor capacidade de obtenção de cálcio livre a partir de reservas intracelulares nestes animais, ou ainda uma inabilidade dos mecanismos que promovem o efluxo deste íon do citosol o que levaria a um relaxamento incompleto, comprometendo o desenvolvimento de força (SHIELS & FARRELL, 1997).

Para que ocorra o relaxamento do músculo cardíaco é necessário que o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular retorne aos valores diastólicos. O efluxo do  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol ocorre por intermédio do trocador NCX, da ATPase sarcolemal e ainda da ação da cálcio-ATPase do RS, conhecida como SERCA (FARRELL et al., 2003; KATZ, 1997).

Em mamíferos, cerca de 70 a 80% do seqüestro de  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol se dá através da ação da SERCA, que bombeia  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior do RS (MUNDIÑA-WEILENMANN et al., 2001). Já nos peixes que possuem RS pouco desenvolvido, a extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  depende fundamentalmente da atividade do NCX (FARRELL et al., 2003).

As situações acima descritas influenciam o desenvolvimento de força, o tempo de contração (TPT – "time to peak tension") e o tempo de relaxamento (THR – "time to half relaxation") por afetar os mecanismos envolvidos no controle do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Para fornecer informações a respeito de tais mecanismos, os pesquisadores vêm utilizando drogas ou procedimentos que bloqueiam o influxo transsarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$  (ex.: verapamil, nifedipina, etc.), que promovem modificação na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol (ex: substâncias inotrópicas), ou ainda que interferem no seu armazenamento no RS (ex: rianodina).

A importância dos íons cálcio no processo de contração muscular, bem como sua origem extra ou intracelular para diferentes estímulos de contração, pode ser avaliada por meio de experimentos que mensurem a força de contração isométrica.

O presente trabalho pretendeu estender alguns dos conhecimentos acima discutidos a uma espécie de teleósteo característica de ambientes neotropicais: o curimatá, *Prochilodus lineatus*. Visando elucidar os efeitos da elevação da temperatura sobre as respostas cronotrópicas e inotrópicas do coração dessa espécie, bem como a influência da concentração de cálcio sobre o sistema contrátil do miocárdio em diferentes condições térmicas, foram realizados experimentos *in vivo* (frequência cardíaca) e *in vitro* (relação força-frequência, estudo da força de contração e do efeito de diferentes substâncias como adrenalina e rianodina).

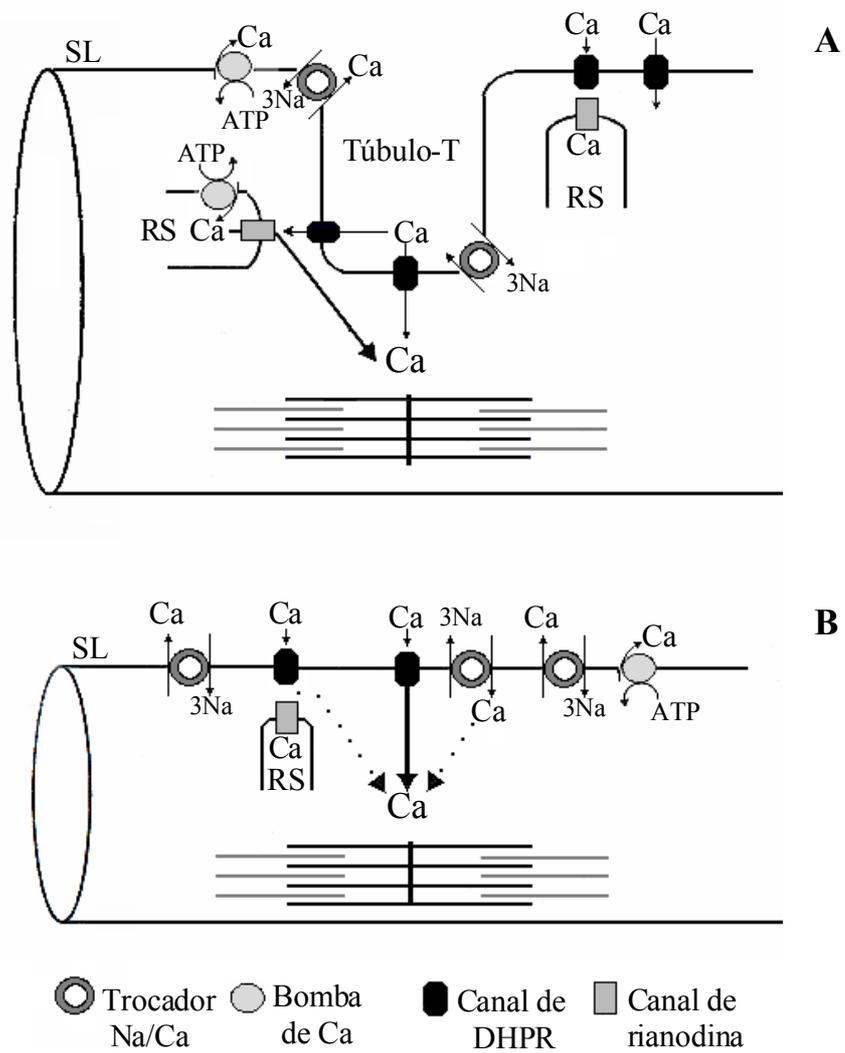


FIGURA 1. Esquema geral do mecanismo de acoplamento excitação – contração E-C do músculo cardíaco, comparando um modelo existente para mamíferos (A) com um proposto para teleósteos (B) (Modificado de Tibbits et al., 1992).

## 1.2. Objetivos

Tendo em vista que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura foram desenvolvidos com animais de clima temperado e que há pouca informação sobre peixes tropicais, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de mudanças agudas na temperatura e as possíveis fontes de cálcio ativador do processo de acoplamento excitação-contração no miocárdio ventricular do teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus*, a saber:

- a. determinar a frequência cardíaca ( $f_H$ ) *in vivo* da espécie quando submetida à transição de temperatura de 25 para 35° C e na recuperação subsequente a 25°C;
- b. comparar as respostas inotrópicas dos anéis ventriculares estimulados eletricamente frente a incrementos na temperatura de 25 para 35° C e retorno subsequente a 25° C;
- c. verificar a importância do cálcio extracelular para o acoplamento excitação – contração cardíaco a 25 e 35° C, por meio da observação das mudanças no desenvolvimento da força e modificações dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR);
- d. verificar o efeito de adições de doses crescentes de adrenalina sobre o desenvolvimento de força e os parâmetros tempo-dependentes;
- e. determinar, indiretamente, a capacidade do RS fornecer cálcio ao aparato contrátil utilizando-se do efeito da pausa diastólica prolongada (5min) sobre o desenvolvimento de força dos anéis ventriculares na presença ou ausência de rianodina;
- f. analisar a contribuição relativa dos diferentes compartimentos celulares (meio extracelular e RS) como fornecedores de cálcio ao aparato contrátil a frequências fisiologicamente relevantes, mediante a verificação dos efeitos dos incrementos progressivos na frequência de estimulação sobre o desenvolvimento de força em preparações controle e com adição de rianodina.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 74 espécimes adultos de curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), de ambos os sexos, pesando entre 90 a 120g.

Os principais fatores que levaram à escolha desta espécie foram o fato de a mesma ser nativa, tipicamente neotropical, migratória e devido a sua importância biológica na fauna local.

### 2.1. Posição Sistemática da Espécie

A espécie em questão ocupa a seguinte posição sistemática de acordo com Valenciennes, (1836):

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Divisão: Teleostei

Superordem: Acanthopterygii

Ordem: Characiformes

Subordem: Characoidei

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus lineatus*

### 2.2. Breves Considerações Sobre a Espécie Estudada

O curimbatá, *Prochilodus lineatus*, também conhecido como curimba, corumbatá e grumatã (figura 2), entre outros, é uma espécie tipicamente neotropical, sendo encontrado naturalmente na bacia superior do rio Paraná (Rios Mogi-Guaçu, Pardo, Grande e Parnaíba) e na Bacia do rio Paraíba (VERANI, 1987; CASTRO, 1993). Esta espécie habita ambientes tipicamente lóticos é bastante ativa, migratória e depende da dinâmica da correnteza fluvial para a desova (BRITO et al., 2003).

São peixes de piracema (reofilicos), ou seja, fazem grandes deslocamentos em cardumes para desovarem. O termo piracema vem do tupi-guarani e aplica-se ao fenômeno da natureza em que os peixes nadam contra a correnteza dos rios quando vão

ao encontro das nascentes na época da desova (BONETTO & PIGNALBERI, 1964; GODOY, 1967; BAYLEY, 1973; ESPINACHROS et al. 1990).

Eles possuem ótimas características para a piscicultura, entre as quais: grande prolificidade (uma única fêmea pode desovar mais de um milhão de óvulos por temporada); seu alimento é barato; desenvolve-se significativamente rápido e sua reprodução artificial é relativamente fácil. São peixes de médio porte e alguns exemplares chegam a pesar mais de 4 Kg (WELCOMME, 1979).

Como peixe de piracema, seu período reprodutivo ocorre na primavera e começo do verão. Eles podem ser observados em corredeiras e obstáculos, dando saltos para transpô-los, mas, talvez, o mais interessante seja o barulho que fazem nestas aglomerações migrantes rio acima (GODOY, 1967). Os peixes vibram uma musculatura especial e, com auxílio da bexiga natatória, produzem um som típico de piracema. Este som, tido por velhos pescadores como uma das coisas mais emocionantes da natureza brasileira, está em vias de desaparecer devido à barragem da correnteza dos rios pelas hidrelétricas (O Canto da Piracema - EPTV).

Um dos grandes problemas para a espécie são as barreiras impostas pelas barragens hidrelétricas que impedem sua piracema. Outro fator é a intensiva captura com redes em épocas reprodutivas.

Durante o acasalamento, que ocorre em locais de correnteza nas cabeceiras dos rios, fêmeas e machos nadam lado a lado para a desova e fecundação.

Apresentam hábito alimentar iliófago, ou seja, alimentam-se de lodo e de detritos que estão no fundo de lagos e rios, sendo que seu longo trato digestório aproveita material nutritivo que outras espécies não conseguem (BOWEN, 1983; FLECKER, 1996). Ainda, sua evolução adaptativa conferiu a essas espécies grande capacidade de freqüentarem ambientes com baixa quantidade de oxigênio dissolvido, característicos desses fundos de leito.

O lodo dos rios, lagos e demais corpos d'água geralmente contém rico material, composto basicamente de resíduos vegetais em decomposição. Este lodo comumente está repleto de pequenos organismos que dele se nutrem, organismos estes que acabarão servindo também de alimento para os peixes iliófagos. É comum encontrar grandes aglomerações destes peixes em áreas com fundos lodosos nas partes baixas (terço final) dos grandes rios, e deslocarem-se numerosamente atrás de novos bancos de alimento.

Os peixes utilizados no presente estudo foram coletados na Cachoeira de Emas, em Pirassununga, município cujo nome significa "lugar onde o peixe faz barulho", na

língua Tupi-Guarani, numa alusão ao ronco do curimbatá macho que, na época da reprodução, ronca para atrair as fêmeas (Geraldo Bernardino - comunicação pessoal).

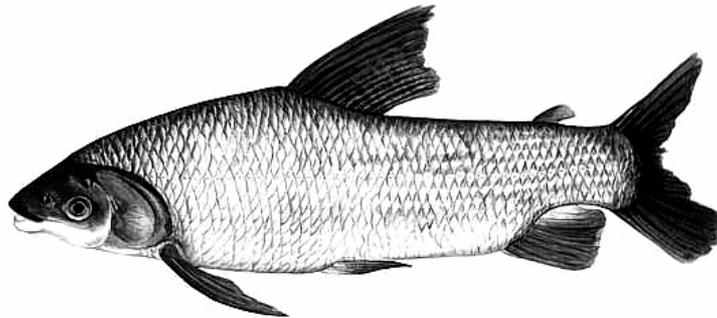


FIGURA 2. Curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Fish base).

### 2.3. Coleta e Manutenção em Laboratório

Os espécimes de curimbatá foram coletados na Cachoeira de Emas, Pirassununga, SP (Rio Mogi-Guaçu) com o auxílio de tarrafas.

Em laboratório, os peixes foram mantidos em tanques de 1000 litros dotados de circulação contínua de água ( $1,2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) e temperatura controlada ( $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por, no mínimo, 45 dias. Os peixes receberam alimentação *ad libitum* consistindo de ração comercial peletizada, segundo metodologia do laboratório.

### 2.4. Preparações Experimentais

#### 2.4.1. Experimentos *in vivo*

As preparações empregadas para a obtenção dos eletrocardiogramas (ECG) para análise da frequência cardíaca ( $f_H$ ) foram baseadas na metodologia utilizada por RANTIN et al. (1993).

Os animais foram pesados e imersos numa solução de benzocaína 0,25% ( $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ ) o que proporcionou um nível de anestesia suficiente, mas com a manutenção dos movimentos respiratórios espontâneos.

Imediatamente, após a anestesia, os peixes foram transferidos para uma mesa cirúrgica para a implantação de dois eletrodos ativos, um na região ventral, próximo ao

coração e outro de referência, na região caudal. Os eletrodos foram suturados com dois pontos cirúrgicos na musculatura corpórea para evitar seu deslocamento. Um terceiro eletrodo (passivo) foi colocado na água da câmara experimental. Os eletrodos foram conectados a um acoplador universal de um fisiógrafo Narcotrace 40<sup>®</sup> (Bio Systems, TX, USA). Essa preparação permitiu a obtenção de registros similares àqueles observados na derivação I (D<sub>I</sub>) da eletrocardiografia padrão.

Após a cirurgia, os peixes foram introduzidos em câmaras de contenção (tubos de PVC), e transferidos para um tanque experimental em que a água foi mantida com oxigenação contínua e na temperatura de aclimação (25° C). A temperatura foi ajustada por um termostato FAC-TempControl (FAC, São Carlos, SP, Brasil).

Seguiu-se, então, um período de recuperação de 12 horas, após o qual a temperatura da água foi aumentada gradativamente (2,5° C a cada 10 min) até atingir 35° C e, subseqüentemente, reduzida para 25° C. Cada temperatura experimental foi mantida por 30 min, após os quais foram realizados registros da  $f_H$  por 2 min. Um esquema dos procedimentos comentados acima pode ser observado na figura 3.

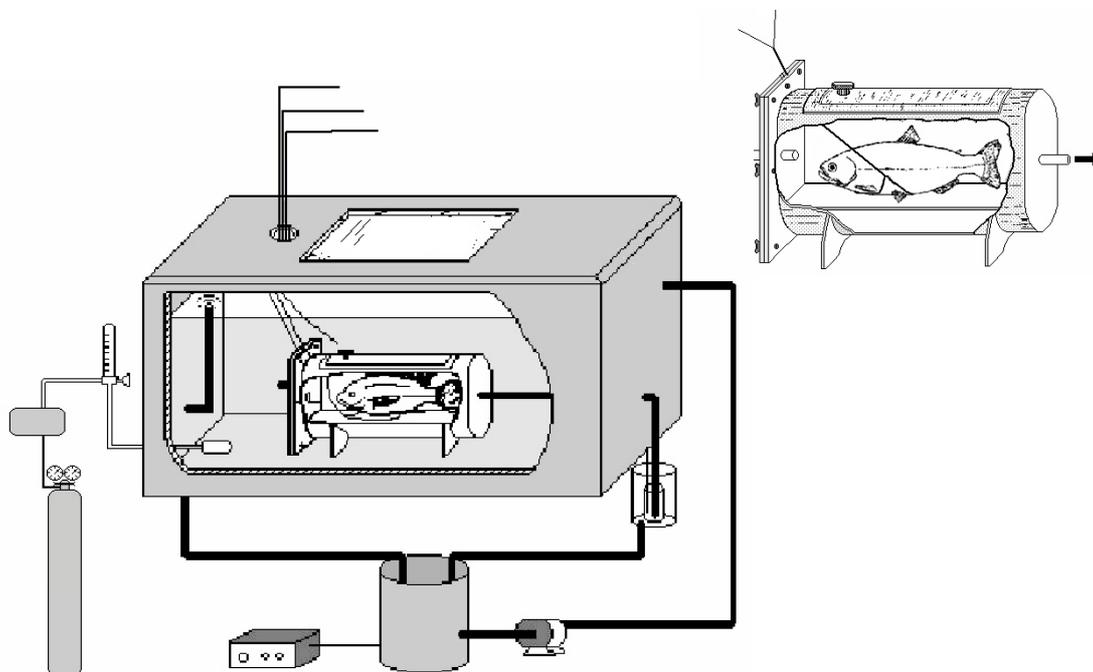


FIGURA 3. Esquema do tanque experimental e do tubo de contenção utilizados para os experimentos de eletrocardiografia.



### 2.4.2. Experimentos *in vitro*

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

Os animais foram sacrificados por meio de um choque traumático na região cefálica e pesados. O coração foi retirado e colocado em uma solução fisiológica própria para peixes teleósteos de água doce, com a seguinte composição:

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

O pH final da solução foi de 7,4 a 25° C.

A quantidade de solução fisiológica necessária para o experimento foi preparada imediatamente antes de iniciá-lo, a partir de soluções estoque que eram mantidas sob refrigeração.

Para o estudo da contratilidade *in vitro* o coração dos animais foi dissecado e cortado transversalmente resultando na formação de dois anéis ventriculares. Cada anel - com espessura de aproximadamente de 1 a 2 mm e 0,3 a 0,6 cm de diâmetro e pesando  $19 \pm 47$  mg – foi transferido imediatamente após a preparação para um banho contendo 50 ml de solução fisiológica já termostatizada à temperatura de 25° C e dotado de borbulhamento constante de mistura carbogênica (2% CO<sub>2</sub> e 98% O<sub>2</sub>). Cada anel ventricular foi fixado a um gancho construído na parte terminal do eletrodo de estimulação e a um outro gancho de aço inox, que por sua vez, era conectado por meio de uma linha cirúrgica (0,7/6-0 - Ethicon®) a um transdutor de força isométrica LETICA TRI-210 (LETICA® Scientific Instruments). Um segundo eletrodo de platina foi colocado no interior do banho, ao lado do primeiro. Os eletrodos de estimulação foram acoplados a estimuladores AVS 100D (AVS Projetos Especiais), os quais geraram pulsos elétricos quadrados com 8 ms de duração e uma voltagem 50% superior àquela que atingia o limiar de resposta mecânica, permitindo, assim, a estimulação elétrica dos anéis para o desenvolvimento da força de contração a diferentes taxas. Estes estimuladores possuem as mesmas especificações eletrônicas dos Grass SD9 (Quincy, Mass., USA).

Os anéis ventriculares foram estimulados 0,2 Hz (0,2 pps ou 12 bpm) e estirados com auxílio de um micromanipulador, com a finalidade de aumentar a distância entre o

transdutor e o gancho de fixação até que uma relação constante entre o comprimento da preparação e o pico de força de contração pudesse ser obtido. O objetivo desse estiramento foi diminuir o impacto da orientação celular indefinida da preparação (GESSER,1996).

Depois da estabilização seguia-se um período de 30 min com estimulação contínua de 0,2 Hz, após o qual os diferentes protocolos experimentais foram aplicados.

#### **2.4.2.1. Protocolos Experimentais**

##### **a) Efeito da Temperatura**

Após estabilização dos anéis ventriculares a 25° C, a temperatura do banho foi aumentada em 2,5° C a cada 10 minutos até atingir 35° C, em seguida, retornou-se a 25°C seguindo o mesmo procedimento. Durante todo o período experimental, registros ininterruptos da força de contração foram realizados em velocidade lenta. A cada temperatura atingida (25° C, 27,5° C, 30° C, 32,5° C, 35° C, 32,5° C, 30° C, 27,5° C, 25° C), foram realizados registros rápidos durante 15-20 segundos.

Este protocolo foi desenvolvido com o intuito de fornecer informações a respeito da influência de elevações agudas da temperatura sobre o desenvolvimento de força de contração isométrica.

##### **b) Efeito do Aumento da Concentração de Cálcio**

Os pares de anéis ventriculares foram estabilizados a 0,2 Hz em um banho contendo 1,25 mM de CaCl<sub>2</sub>, por um período de aproximadamente 15 min. Após este período, foram efetuados registros do desenvolvimento de força isométrica das anéis por 3 min. A seguir, a concentração de CaCl<sub>2</sub> de um dos anéis foi elevada em 2 mM. Os registros de força de contração isométrica em cada concentração de Ca<sup>2+</sup> foram realizados até que a mesma produzisse seu efeito completo (estabilizassem o desenvolvimento de força) e, então, as anéis recebiam uma nova adição de 2 mM de Ca<sup>2+</sup>. Esse protocolo foi repetido até que não se observasse efeito significativo da nova adição de Ca<sup>2+</sup> sobre a força contrátil e foi aplicado tanto a 25° C quanto a 35° C.

##### **c) Efeito da Adrenalina**

Após os pares de anéis ventriculares terem sido estabilizados, como já descrito para os protocolos anteriores, (para ambas as temperaturas), a concentração de cálcio foi mantida em ambas as preparações em 1,25 mM. Nessas condições, os registros de força

obtidos foram tomados como controle (ou 0 adrenalina). Subseqüentemente, uma das preparações recebeu doses crescentes de adrenalina (Merck<sup>®</sup> -C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>). Cada concentração era mantida até que tivesse exercido seu efeito completo. As doses adicionadas foram as seguintes: 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 5·10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M e 10<sup>-5</sup> M.

As soluções estoque de adrenalina em concentrações adequadas foram previamente preparadas e mantidas sob refrigeração (aproximadamente 4° C). No momento da condução de cada experimento eram acrescentadas ao banho quantidades necessárias de cada estoque de adrenalina para perfazer as diferentes concentrações utilizadas.

Este protocolo foi realizado com o objetivo de fornecer informações sobre a capacidade máxima do acoplamento excitação-contração e a modulação adrenérgica na contratilidade cardíaca nas diferentes temperaturas.

#### **d) Tensão Pós-Pausa**

Este procedimento foi conduzido com o intuito de fornecer uma noção da capacidade de armazenamento intracelular de cálcio durante uma pausa diastólica prolongada e não fisiológica.

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

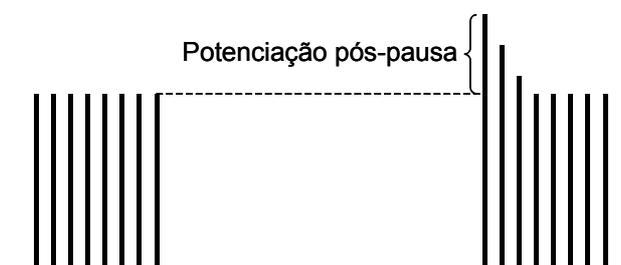


FIGURA 4. Esquema do registro de força de contração isométrica antes e depois de uma pausa diastólica prolongada, mostrando a potenciação da mesma.

Com o objetivo de determinar-se a importância funcional do retículo sarcoplasmático na espécie, o protocolo experimental acima descrito foi repetido,

porém, um dos banhos recebeu 10  $\mu\text{M}$  de rianodina (Sigma -  $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_9$ ) 30 min antes do início do experimento.

Tais procedimentos foram realizados a 25° C e 35° C.

#### **e) Relação Força-Freqüência**

Preparações pares sofreram progressivos aumentos na taxa de estimulação, a partir de 0,2 Hz, até que 80 % dos registros obtidos se tornassem irregulares. Após cada incremento na taxa de estimulação foram efetuados registros em alta velocidade durante 15-20 segundos para as medidas de possíveis variações na força de contração. Estas preparações foram denominadas preparações controle.

Adicionalmente, o grau de envolvimento do retículo sarcoplasmático no desenvolvimento de tensão foi avaliado em um outro protocolo experimental pela aplicação de 10  $\mu\text{M}$  de rianodina às preparações. Nestes experimentos, a rianodina foi acrescentada ao banho 30 min antes das alterações na freqüência.

Tem sido proposto (NAYLER et al., 1970; ROUSSEAU et al., 1987; HILGEMANN et al., 1989; MEISSNER et al., 1997) que a rianodina, um alcalóide neutro retirado do vegetal *Ryania speciosa* (JONES et al., 1979), liga-se específica e irreversivelmente aos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS) e, quando utilizada em concentrações micromolares (10-300  $\mu\text{M}$ ) (CORONADO et al., 1994), provoca uma diminuição da condutância destes canais ao cálcio, inibindo assim a função do RS como fornecedor de cálcio ao aparato contrátil do músculo cardíaco.

Dessa forma, a rianodina, na concentração utilizada no presente estudo (10  $\mu\text{M}$ ), tem sido empregada para o teste da importância funcional do retículo sarcoplasmático no acoplamento excitação-contração de diversos vertebrados, inclusive peixes (DRIEDZIC & GESSER, 1988; HOVE-MADSEN, 1992; KEEN et al., 1994; GESSER, 1996). Estes protocolos experimentais foram realizados tanto a 25° C quanto a 35° C.

#### **2.4.3. Análise dos Resultados**

**a. Freqüência cardíaca in vivo ( $f_H$ ):** expressa em batimentos cardíacos por minutos (bpm).

**b. Força de contração (Fc):** A força de contração (Fc) foi dada como uma porcentagem dos valores iniciais, ou seja:

- Nos experimentos nos quais foi analisado o efeito da adição de concentrações crescentes de cálcio ao meio extracelular a 25° C, os valores obtidos foram representados como uma porcentagem da força de contração observada na menor concentração extracelular de cálcio (1,25 mM). Adicionalmente, os valores de força a 25° C foram utilizados como 100% para a análise da força desenvolvida pelos anéis ventriculares a 35° C;
- Nos experimentos nos quais foi analisado o efeito da adição de concentrações crescentes de adrenalina ao meio extracelular a 25° C, os valores obtidos foram representados como uma porcentagem da força de contração observada na ausência de adrenalina (controle). Adicionalmente, os valores de força a 25° C foram utilizados como 100% para a análise da força desenvolvida pelos anéis ventriculares a 35° C;
- Nos experimentos nos quais foi analisado o efeito do aumento da frequência de estimulação dos anéis ventriculares sobre o desenvolvimento de força (Ctrl), os valores obtidos nas diferentes frequências foram dados como uma porcentagem da força de contração observada na menor frequência (0,2 Hz ou 12bpm). Este primeiro valor de força a 25° C foi utilizado como 100% para a análise da força desenvolvida pelos anéis ventriculares após o tratamento com rianodina. Os valores de força obtidos para as preparações controle a 25° C também foram utilizados como sendo 100% para a análise da força desenvolvida pelas preparações controle 35° C e tratadas com rianodina a 25° C. As preparações tratadas com rianodina a 25° C foram utilizadas como sendo 100% para a análise da força desenvolvida pelas preparações tratadas com rianodina a 35° C;
- Tensão Pós-Pausa: os valores da tensão pós-pausa na presença ou ausência de rianodina foram dados como uma porcentagem da última contração registrada anteriormente ao repouso (pré-pausa) em ambas as temperaturas.

**c. Cinética da Contração:**

- **Tempo para o Pico de Tensão (TPT – Time to Peak Tension):** expresso em milissegundos (ms). Os valores de TPT obtidos em um mesmo protocolo experimental foram comparados aos valores iniciais. Adicionalmente, os pontos

correspondentes de diferentes protocolos experimentais também foram comparados entre si.

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

**d. Q<sub>10</sub>:** Corresponde à razão entre a velocidade de uma reação fisiológica em uma determinada temperatura e a velocidade dessa reação numa temperatura 10 °C inferior ou superior.

Uma representação de um registro da força de contração em alta velocidade com os parâmetros analisados é mostrada na figura 5.

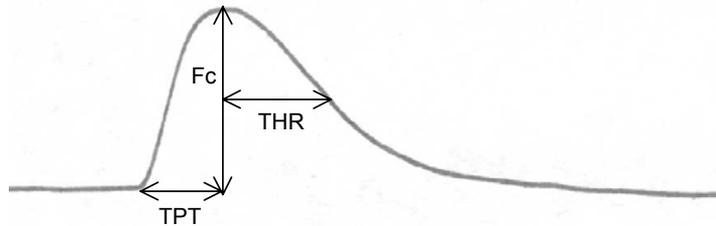


FIGURA 5. Esquema mostrando as variáveis medidas no registro de força de contração isométrica no presente estudo. Fc: Força de contração; TPT: Tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: Tempo necessário para que ocorra 50 % do relaxamento.

#### 2.1.1.1. Tratamento Estatístico dos Dados

A análise estatística dos dados do presente estudo foi realizada com o auxílio do software GraphPad InStat versão 2.01 (San Diego, CA, EUA). Os seguintes procedimentos estatísticos foram adotados:

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

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Freqüência Cardíaca *In Vivo*.

Os valores médios da freqüência cardíaca ( $f_H$  - bpm) de curimbatá, ( $n = 10$ ;  $W_t = 112,6 \pm 12,6g$ ), frente a elevação da temperatura de  $25^\circ C$  para  $35^\circ C$  e durante o retorno subsequente a  $25^\circ C$ , são apresentados na tabela 1 e representados graficamente na figura 6. Nessa figura encontra-se também representado o valor de  $Q_{10}$  para a  $f_H$  em função da variação de temperatura de  $25$  para  $35^\circ C$ .

A  $25^\circ C$ , a  $f_H$  foi de  $49,3 \pm 3,7$  bpm, aumentando progressiva e significativamente a partir desta temperatura, atingindo seus maiores valores a  $32,5^\circ C$  ( $117,8 \pm 5,6$  bpm).

No retorno subsequente à temperatura de aclimatação, os valores de  $f_H$  recuperaram os valores inicialmente observados em cada temperatura, inclusive a  $25^\circ C$  ( $52,5 \pm 5,0$  bpm).

TABELA 1. Valores de frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) *in vivo* de curimatá, em resposta à elevação de temperatura de 25° C para 35° C e retorno subsequente para 25° C (n = 10). Valores médios  $\pm$  E.P.M.

Temperatura (°C)	$f_H$ (bpm)
25,0	49,3 $\pm$ 3,7
27,5	74,8 $\pm$ 6,7
30	89,4 $\pm$ 6,3
32,5	117,8 $\pm$ 5,6
35,0	115,0 $\pm$ 5,3
32,5	107,9 $\pm$ 4,5
30,0	99,5 $\pm$ 4,7
27,5	74,5 $\pm$ 5,0
25,0	52,5 $\pm$ 5,0

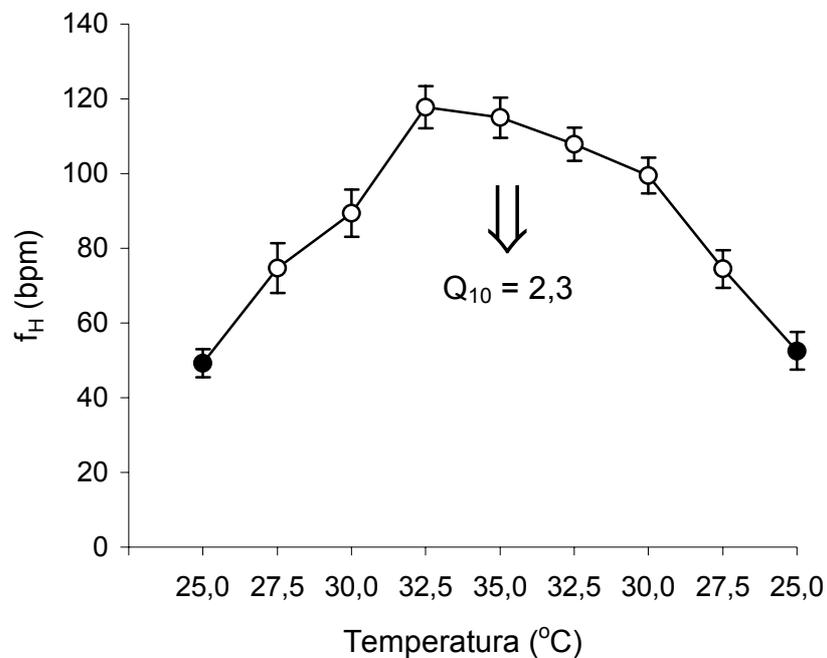


FIGURA 6. Efeito da elevação gradual da temperatura de 25° C para 35° C e do retorno subsequente para 25° C sobre a frequência cardíaca *in vivo* ( $f_H$  – bpm) de curimatá (n = 10). Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

## **3.2. Anéis ventriculares.**

### **3.2.1. Efeito da elevação da temperatura.**

#### **3.2.1.1. Força de Contração (Fc).**

Os valores médios da força de contração (Fc) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá submetidos à elevação gradual da temperatura de 25° C para 35° C e retorno subsequente a 25° C em um meio contendo 1,25 mM de Ca<sup>2+</sup> (n = 10) são apresentados na tabela 2 e representados graficamente na figura 7.

Os resultados deste experimento indicam redução progressiva da força a qual tornou-se significativa a partir 32,5° C (p > 0,05). No retorno subsequente a força desenvolvida recuperou os valores iniciais observados a 25° C.

#### **3.2.1.2. Tempos de Contração e Relaxamento Cardíacos (TPT e THR).**

A tabela 2 apresenta os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes (tempo para o pico de força = Time to Peak Tension - TPT) e tempo para 50% do relaxamento muscular (tempo para 50% do relaxamento muscular = Time to half Relaxation - THR) desenvolvidos pelos anéis ventriculares de curimatá (n = 10) em resposta à elevação gradual da temperatura de 25° C para 35° C e o retorno à temperatura de aclimação em um meio contendo 1,25mM de Ca<sup>2+</sup> (n = 10). Estes valores também se encontram representados graficamente na figura 8.

A elevação gradual na temperatura promoveu redução significativa (p > 0,05) tanto nos valores de TPT quanto nos de THR a partir de 30° C, atingindo os menores valores a 35° C. No entanto, com o retorno subsequente à temperatura de aclimação (25° C), semelhante ao observado para a força, houve a recuperação destes parâmetros aos valores iniciais.

TABELA 2. Valores da força de contração (Fc – % dos valores iniciais), do tempo para o pico de força (TPT – ms) e do tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvidos pelos anéis ventriculares de curimatá (n = 10) durante a elevação da temperatura de 25° C para 35° C e no retorno subsequente para 25 °C. Valores médios  $\pm$  E.P.M.

Temperatura (°C)	Fc (%)	TPT (ms)	THR (ms)
25,0	100,0 $\pm$ 0,0	446,0 $\pm$ 14,6	282,0 $\pm$ 19,0
27,5	94,0 $\pm$ 1,7	390,0 $\pm$ 12,4	222,0 $\pm$ 12,1
30,0	88,6 $\pm$ 2,4	354,0 $\pm$ 13,3	204,0 $\pm$ 16,3
32,5	83,3 $\pm$ 2,4	310,0 $\pm$ 12,4	204,0 $\pm$ 27,6
35,0	73,3 $\pm$ 2,8	296,0 $\pm$ 17,6	178,0 $\pm$ 10,5
32,5	73,3 $\pm$ 3,5	308,0 $\pm$ 6,1	184,0 $\pm$ 10,7
30,0	72,8 $\pm$ 4,9	364,0 $\pm$ 12,6	204,0 $\pm$ 11,1
27,5	82,0 $\pm$ 5,0	420,0 $\pm$ 13,7	220,0 $\pm$ 13,7
25,0	87,1 $\pm$ 5,3	424,0 $\pm$ 14,8	244,0 $\pm$ 15,1

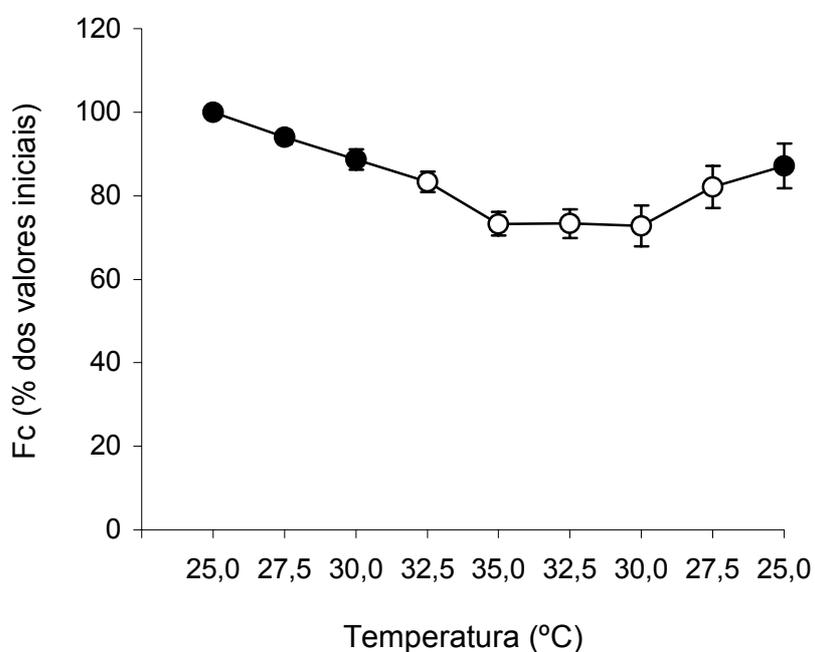


FIGURA 7. Efeito da elevação da temperatura de 25° C para 35° C e do retorno subsequente para 25° C sobre a força de contração (Fc – % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá (n = 10). Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

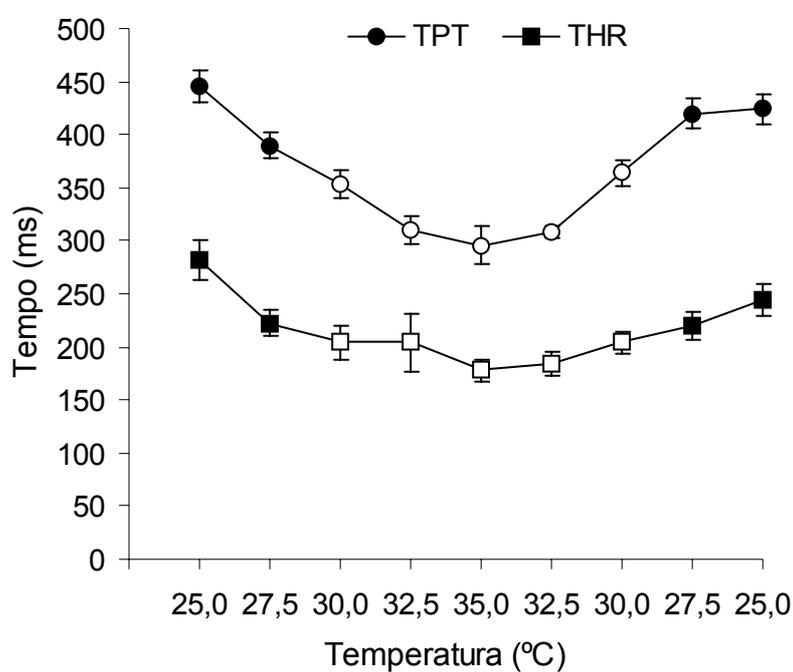


FIGURA 8. Efeito da elevação da temperatura de 25° C para 35° C e do retorno subsequente para 25° C sobre o tempo para o pico de força (TPT – ms) e o tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) desenvolvidos por anéis ventriculares de curimatá (n = 10). Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

### **3.2.2. Efeito da Elevação na Concentração de Cálcio Extracelular**

#### **3.2.2.1. Força de Contração (Fc)**

Os valores médios da força de contração (Fc - % valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá submetidos a elevações da concentração de cálcio de 1,25 mM para 11,25 mM a 25° C e 35° C (n = 8) são apresentados na tabela 3 e, representados, graficamente, na figura 9.

A elevação nas concentrações extracelulares de cálcio promoveu aumento da força em ambas as temperaturas. Esse aumento foi progressivo e tornou-se significativo ( $p > 0,05$ ) a partir de 5,25 mM para ambas as temperaturas, correspondendo a ~ 69% a 25° C e 63% a 35° C. A força desenvolvida pelos anéis ventriculares também foi significativamente menor na temperatura de 35° C, quando comparada com 25° C em todas as concentrações testadas.

#### **3.2.2.2. Tempos de Contração e Relaxamento Cardíacos (TPT e THR)**

A tabela 4 apresenta os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes - tempo para o pico de tensão (TPT) e tempo para 50% do relaxamento (THR) desenvolvidos pelos anéis ventriculares de curimatá em resposta a elevações na concentração de cálcio extracelular de 1,25mM para 11,25mM a 25 e 35° C (n = 8). Estes valores também se encontram representados graficamente na figura 10.

Ao comparar o TPT e o THR numa mesma concentração de  $Ca^{2+}$ , nas diferentes temperaturas, observou-se que estes parâmetros são sempre significativamente ( $p < 0,05$ ) menores nos experimentos desenvolvidos a 35° C.

Os incrementos na concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular promoveram aumento no TPT em ambas as temperaturas testadas. Esse aumento se tornou significativo ( $p < 0,05$ ) a partir de 7,25 mM a 25° C e 5,25 mM a 35° C. Já o THR permaneceu constante a 35° C e sofreu alterações significativas ( $p < 0,05$ ) nas concentrações 9,25 e 11,25 mM a 25° C.

TABELA 3. Valores da força de contração (Fc - % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá (n = 8) durante a elevação gradual da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$  - mM) nas temperaturas de 25°C e 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os valores obtidos a 25° C e 35° C ( $p < 0,05$ ).

$[\text{Ca}^{2+}]_e$ (mM)	Fc (%)	
	25°C	35°C
1,25	100,0 $\pm$ 0,0	33,8 $\pm$ 18,1*
3,25	144,5 $\pm$ 13,3	53,7 $\pm$ 24,9*
5,25	169,1 $\pm$ 15,8	63,4 $\pm$ 29,0*
7,25	178,3 $\pm$ 15,9	67,2 $\pm$ 30,5*
9,25	186,0 $\pm$ 16,0	70,4 $\pm$ 31,7*
11,25	193,8 $\pm$ 19,0	74,7 $\pm$ 32,7*

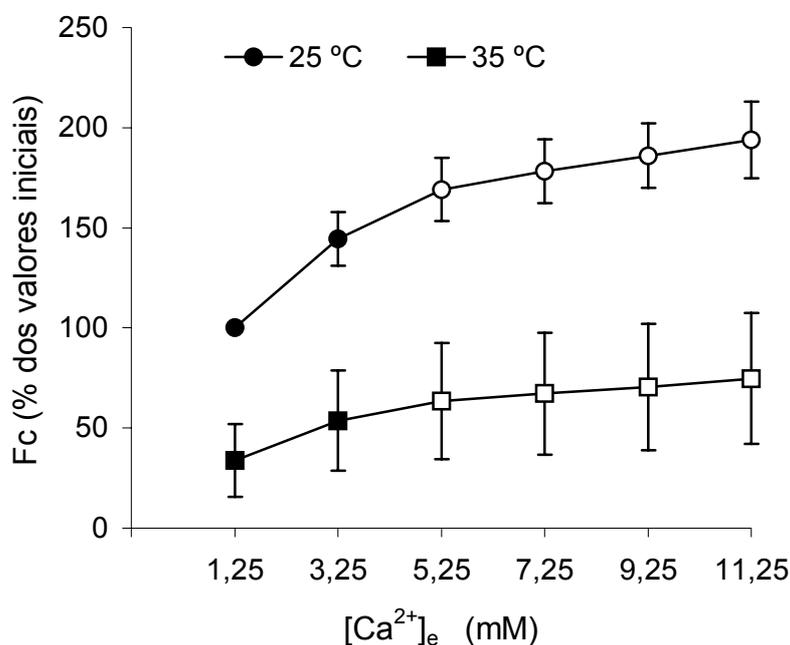


FIGURA 9. Efeito de aumentos na concentração extracelular de cálcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$  - mM) sobre o desenvolvimento de força de contração (Fc - % dos valores iniciais) dos anéis ventriculares de curimatá (n = 8) nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

TABELA 4. Valores do tempo para o pico de tensão (TPT – ms) e do tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) de curimatá (n = 10) durante a elevação gradual da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$  - mM) nas temperaturas de 25°C e 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os valores obtidos a 25° C e 35° C ( $p < 0,05$ ).

$[\text{Ca}^{2+}]_e$ (mM)	TPT (ms)		THR (ms)	
	25°C	35°C	25°C	35°C
1,25	434,0 $\pm$ 15,8	248,0 $\pm$ 6,1*	294,0 $\pm$ 18,9	166,0 $\pm$ 9,5*
3,25	472,0 $\pm$ 16,7	278,0 $\pm$ 11,7*	336,0 $\pm$ 23,2	176,0 $\pm$ 10,2*
5,25	494,0 $\pm$ 15,2	300,0 $\pm$ 10,7*	344,0 $\pm$ 18,1	204,0 $\pm$ 15,1*
7,25	522,0 $\pm$ 17,5	304,0 $\pm$ 12,2*	370,0 $\pm$ 20,1	192,0 $\pm$ 11,6*
9,25	526,0 $\pm$ 15,2	304,0 $\pm$ 11,1*	387,0 $\pm$ 15,1	196,0 $\pm$ 14,2*
11,25	532,0 $\pm$ 18,9	316,0 $\pm$ 9,3*	386,0 $\pm$ 13,3	198,0 $\pm$ 15,0*

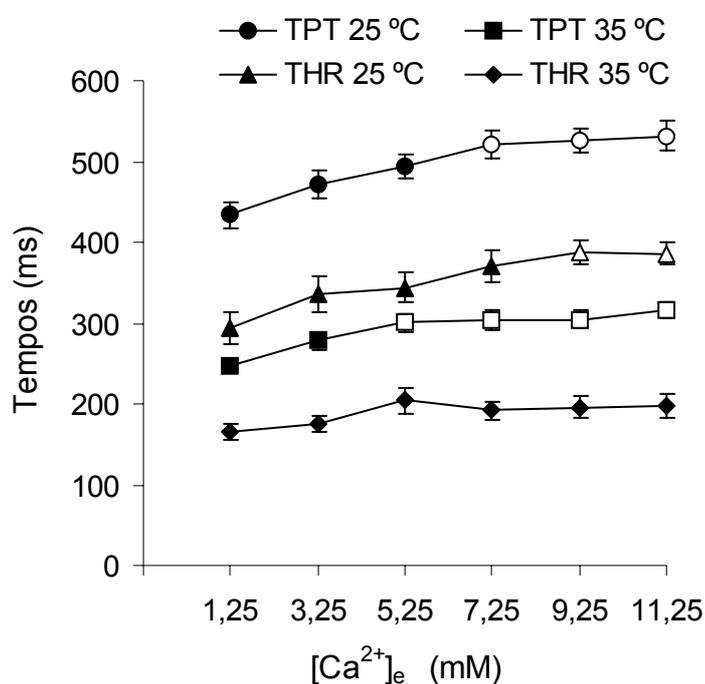


FIGURA 10. Efeito de aumentos na concentração extracelular de cálcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$  - mM) sobre o tempo para o pico de tensão (TPT – ms) e do tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) de anéis ventriculares de curimatá (n = 10) nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

### **3.2.3. Efeito da adrenalina**

#### **3.2.3.1. Força de Contração (Fc)**

Os valores médios ( $\pm$  E.P.M.) da força de contração isométrica (Fc - % dos valores iniciais) desenvolvida por anéis ventriculares de curimatá em concentrações crescentes de adrenalina a 25° C e 35° C (n = 9) são apresentados na tabela 5 e representados graficamente na figura 11. Os dados obtidos mostram que a utilização desse agonista a 25° C não promoveu modificações significativas na Fc. Já os valores da Fc obtidos a 35° C mostraram que a adição da adrenalina resultou num efeito inotrópico positivo progressivo, que se tornou significativo a partir da concentração  $10^{-6}$ .

Nessa figura observa-se também que, nas concentrações  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$  e  $10^{-6}$ , o desenvolvimento da força é significativamente menor a 35 °C, quando comparado com 25° C, e que, na maior dose ( $10^{-5}$ ), os valores de força desenvolvida igualam-se aqueles observados nas condições controle (25° C).

#### **3.2.3.2. Tempos de Contração e Relaxamento Cardíacos (TPT e THR).**

Os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) em resposta à adição de doses crescentes de adrenalina a 25° C e 35° C (n = 9) podem ser observados na tabela 6. Esses valores encontram-se também representados graficamente na figura 12.

Apesar da adição desse agonista promover inotropismo positivo, a análise estatística revela que não existe diferença entre os valores de TPT das preparações controle e aqueles desenvolvidos pelas preparações que receberam as maiores doses de adrenalina ( $10^{-5}$ ) em ambas as temperaturas testadas.

O comportamento do THR foi semelhante ao observado para o TPT, permanecendo constante frente às doses crescentes de adrenalina tanto a 25° C quanto a 35° C.

A análise mostra também que existe diferença significativa entre as duas temperaturas em todas as concentrações testadas. Sendo que os valores obtidos para 35°C são sempre menores, quando comparados com o controle (25° C), indicando contração e relaxamento mais rápidos.

TABELA 5. Valores da força de contração (Fc - % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá (n = 9) durante a elevação gradual da concentração de adrenalina (M) no meio extracelular nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os valores obtidos a 25° C e 35° C numa mesma concentração de adrenalina ( $p < 0,05$ ).

[Adrenalina] (M)	Fc (%)	
	25° C	35° C
0	100,0 $\pm$ 0,0	38,5 $\pm$ 3,6*
10 <sup>-8</sup>	96,6 $\pm$ 1,5	42,4 $\pm$ 4,0*
10 <sup>-7</sup>	96,8 $\pm$ 2,9	50,6 $\pm$ 4,3*
5.10 <sup>-7</sup>	97,0 $\pm$ 2,7	57,1 $\pm$ 4,2*
10 <sup>-6</sup>	92,5 $\pm$ 3,6	70,5 $\pm$ 6,4*
10 <sup>-5</sup>	91,7 $\pm$ 3,4	79,4 $\pm$ 9,4

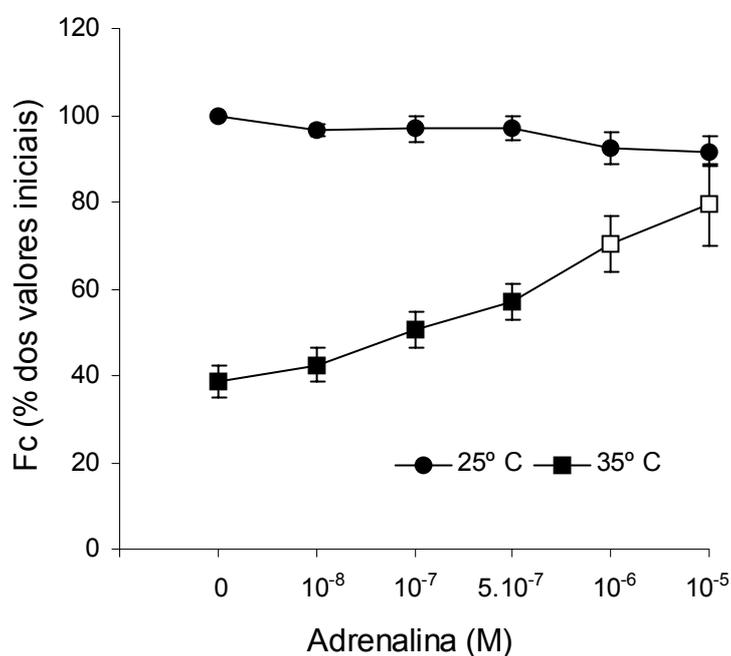


FIGURA 11. Efeito de aumentos na concentração extracelular de adrenalina (M) sobre o desenvolvimento de força de contração (Fc - % dos valores iniciais) de anéis ventriculares de curimatá (n = 9) nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

TABELA 6. Valores da força de contração (Fc - % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá (n = 9) durante a elevação gradual da concentração de adrenalina (M) nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os valores obtidos a 25° C e 35° C numa mesma concentração de adrenalina (p < 0,05).

[Adrenalina] (M)	TPT (ms)		THR (ms)	
	25°C	35°C	25°C	35°C
0	424,0 $\pm$ 13,6	308,0 $\pm$ 9,0*	304,0 $\pm$ 14,8	186,0 $\pm$ 7,9*
10 <sup>-8</sup>	416,0 $\pm$ 13,6	292,0 $\pm$ 8,0*	292,0 $\pm$ 13,4	184,0 $\pm$ 7,2*
10 <sup>-7</sup>	418,0 $\pm$ 10,5	300,0 $\pm$ 6,0*	290,0 $\pm$ 10,0	172,0 $\pm$ 10,0*
5.10 <sup>-7</sup>	424,0 $\pm$ 9,3	300,0 $\pm$ 5,2*	312,0 $\pm$ 14,4	162,0 $\pm$ 7,6*
10 <sup>-6</sup>	416,0 $\pm$ 12,2	290,0 $\pm$ 5,4*	324,0 $\pm$ 12,6	164,0 $\pm$ 7,8*
10 <sup>-5</sup>	408,0 $\pm$ 11,6	290,0 $\pm$ 5,4*	344,0 $\pm$ 14,8	156,0 $\pm$ 5,0*

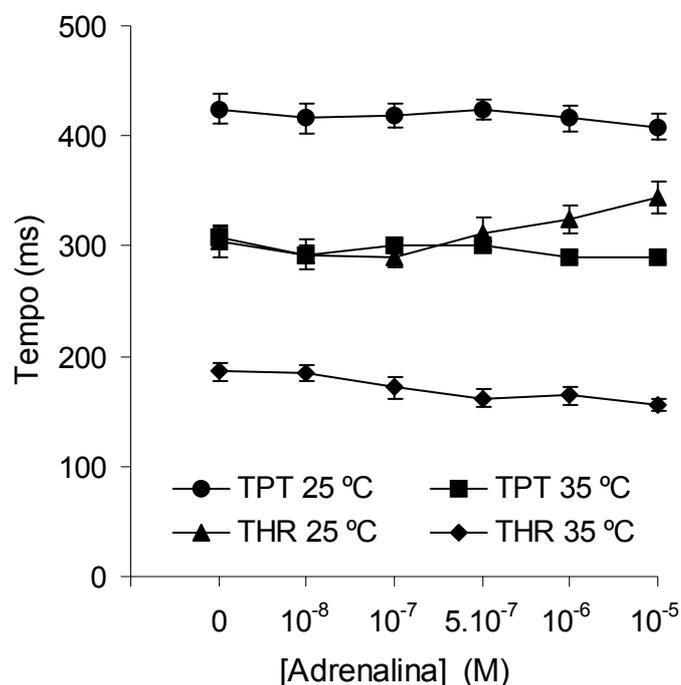


FIGURA 12. Efeito de aumentos na concentração extracelular de adrenalina (M) sobre o tempo para o pico de tensão (TPT – ms) e do tempo para 50% do relaxamento (THR – ms) dos anéis ventriculares de curimatá (n = 9) nas temperaturas de 25 e 35 °C. Valores médios  $\pm$  E.P.M.

### 3.2.4. Tensão Pós - Repouso

Os valores médios da força de contração ( $F_c$  - % da força desenvolvida na última contração precedente ao repouso) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá, em resposta a 5min de pausa diastólica a 25 e 35° C, na presença ou ausência de rianodina ( $n = 10$ ), estão apresentados na tabela 7 e representados graficamente na figura 13.

Na temperatura de 25° C, a pausa diastólica prolongada de 5 min promoveu um aumento significativo na força de contração isométrica (~ 61%) quando comparada com os valores pré-pausa. Já a 35° C, verificou-se uma potenciação significativa da  $F_c$  desenvolvida pelas preparações controle de aproximadamente 27% em relação aos valores obtidos antes da pausa.

Tanto a 25° C quanto a 35° C, os valores de  $F_c$  das preparações controle foram sempre significativamente superiores aos obtidos na presença de rianodina. A adição deste alcalóide aboliu a potenciação pós-pausa em ambas as temperaturas, sendo que os valores de  $F_c$  desenvolvidos após a adição de rianodina não foram significativamente diferentes daqueles observados antes da pausa.

Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de  $F_c$  das preparações controle a 25° C e 35° C, o mesmo ocorrendo com as preparações tratadas com rianodina.

TABELA 7. Força desenvolvida na primeira contração (Fc - % da força desenvolvida na última contração precedente ao repouso) após 5 minutos de pausa diastólica pelos anéis ventriculares de curimatá sobre diferentes temperaturas em preparações controle (n = 10) e tratadas com 10  $\mu$ M de rianodina (n = 10). Os valores são médias  $\pm$  E.P.M.

Temperatura	Controle (%)	Rianodina (%)
25° C	161,3 $\pm$ 27,1	96,1 $\pm$ 5,4
35° C	127,4 $\pm$ 7,0	95,2 $\pm$ 4,9

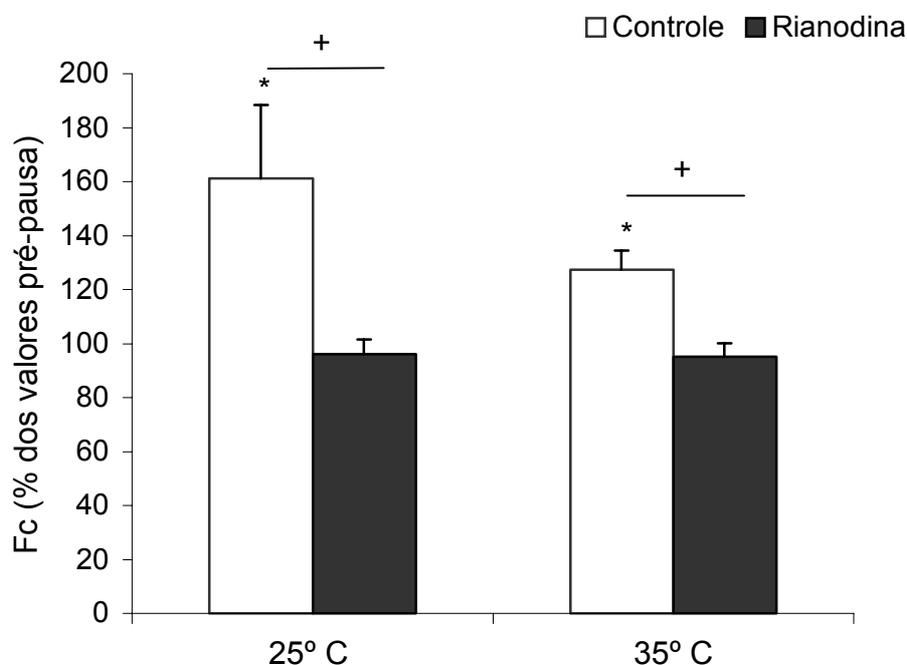


FIGURA 13. Efeito da temperatura sobre a tensão pós-pausa (Fc - % da força desenvolvida na última contração precedente ao repouso) dos anéis ventriculares de curimatá após uma pausa em preparações controle e tratadas com 10  $\mu$ M de rianodina. Uma frequência de estimulação de 0,2 Hz foi seguida por uma pausa diastólica de 5 min. As barras verticais representam valores médios  $\pm$  E.P.M. Asteriscos acima das barras = diferença significativa em relação aos valores pré-pausa ( $p < 0.05$ ). Sinais de mais acima das linhas horizontais = diferença significativa entre os valores controle e após adição de rianodina ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.5. Efeito do Aumento na Frequência de Estimulação

Os efeitos de incrementos sucessivos na frequência de estimulação imposta sobre os anéis ventriculares de curimatá a 25° C (n = 10) e 35° C (n = 10) (preparações controle) e com a adição de 10µM (n = 8) foram verificados utilizando a força de contração (Fc - % dos valores iniciais) e tensão de repouso (RT - % dos valores iniciais). Esses valores são médias ± E.P.M., e são apresentados a seguir.

#### a) 25° C - Controle *versus* 25° C – Rianodina

Os valores médios (± E.P.M.) da força de contração (Fc - % dos valores iniciais), desenvolvidos pelos anéis ventriculares de curimatá a 25° C (preparações controle) (n = 10) e com a adição de 10 µM de rianodina (n = 10) frente a incrementos na frequência de estimulação estão elencados na tabela 8. Essas variáveis também se encontram representadas graficamente na figura 14.

Nas preparações controle os incrementos na frequência de estimulação promoveram reduções progressivas na Fc, essas reduções tornaram-se significativas a partir da frequência de 0,6 Hz. Nessa frequência, a força desenvolvida foi de ~ 80% que representa uma redução de 20%, os menores valores de força observados nesta preparação foram de ~ 23% numa frequência de 1,8 Hz (redução de 77%).

O aumento na frequência também promoveu reduções no desenvolvimento de força nas preparações com adição de rianodina. Entretanto, estes valores só se tornaram significativos na frequência de 1,2 Hz onde foi observada uma redução na força de ~14%. A 2,0Hz a redução foi de 23% (ver tabela). A tabela mostra também que tanto em baixas frequências (0,2, 0,4 e 0,6 Hz), quanto em frequências fisiologicamente relevantes (0,8 e 1,0 Hz) a adição de rianodina reduziu significativamente a força de contração isométrica.

Após frequência de 18 Hz (25° C) e 20 Hz (35° C) os registros tornaram-se irregulares e o experimento foi interrompido em ambas as preparações.

TABELA 8. Valores da força de contração (Fc – % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá, em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações controle (n = 10) e após tratamento com 10  $\mu$ M de rianodina (n = 10), na temperatura de 25° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação aos valores controle (p < 0,05).

Frequência (Hz)	Fc (%)	
	Controle	Rianodina
0,2	100,0 $\pm$ 0,0	52,7 $\pm$ 4,3*
0,4	91,7 $\pm$ 1,3	54,7 $\pm$ 4,2*
0,6	80,3 $\pm$ 1,9	51,9 $\pm$ 4,3*
0,8	70,4 $\pm$ 3,0	48,3 $\pm$ 4,5*
1,0	61,6 $\pm$ 2,2	44,3 $\pm$ 4,6*
1,2	46,8 $\pm$ 2,9	38,0 $\pm$ 4,4
1,4	35,4 $\pm$ 3,0	32,4 $\pm$ 4,4
1,6	26,3 $\pm$ 3,1	25,0 $\pm$ 3,9
1,8	23,3 $\pm$ 3,5	19,8 $\pm$ 3,3
2,0	-	15,1 $\pm$ 2,8

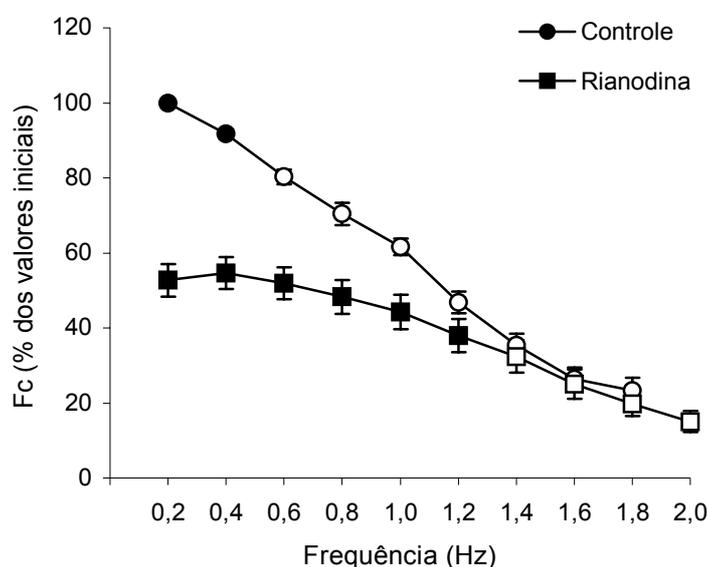


FIGURA 14. Efeito de aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) sobre a força de contração (Fc – % dos valores iniciais) dos anéis ventriculares de curimatá, em preparações controle (n = 10) e após tratamento com 10  $\mu$ M de rianodina (n = 10), na temperatura de 25° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (p < 0,05).

**b) 35° C - Controle *versus* 35° C – Rianodina**

A tabela 9 apresenta os valores médios ( $\pm$  E.P.M.) da força de contração ( $F_c$  - % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá a 35° C (preparações controle) e 35° C com a adição de 10 $\mu$ M de rianodina (n = 10) frente a incrementos na frequência de estimulação. Essas variáveis também se encontram representadas graficamente na figura 15.

Os resultados deste protocolo demonstram que, semelhante ao observado no experimento anterior o aumento na frequência de estimulação teve efeito inotrópico negativo sobre o desenvolvimento de força, tanto na ausência quanto na presença de rianodina. Essa redução tornou-se significativa ( $p < 0,05$ ) a partir de 1,8 Hz, em ambos os protocolos desenvolvidos, apresentando redução de 22% nas preparações controle (35° C) e 28 % nas preparações com rianodina.

Nessa temperatura a adição de rianodina provocou redução no desenvolvimento de força em todas as frequências testadas.

Após as frequências de 2,2 Hz para o controle e 2,0 Hz para os protocolos tratados com rianodina, os registros tornaram-se irregulares e foram interrompidos.

TABELA 9. Valores da força de contração (Fc – % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá, em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações controle e após tratamento com 10  $\mu$ M de rianodina (n = 10), na temperatura de 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação aos valores controle (p < 0,05).

Frequência (Hz)	Fc (%)	
	Controle	Rianodina
0,2	100,0 $\pm$ 0,0	48,5 $\pm$ 3,3*
0,4	100,5 $\pm$ 1,1	45,5 $\pm$ 5,1*
0,6	98,8 $\pm$ 1,5	42,8 $\pm$ 6,4*
0,8	97,4 $\pm$ 2,0	39,3 $\pm$ 6,9*
1,0	95,0 $\pm$ 2,2	35,1 $\pm$ 6,4*
1,2	90,5 $\pm$ 3,0	30,9 $\pm$ 6,7*
1,4	88,3 $\pm$ 3,4	26,7 $\pm$ 6,0*
1,6	83,8 $\pm$ 3,7	26,1 $\pm$ 6,2*
1,8	78,4 $\pm$ 4,4	20,0 $\pm$ 4,3*
2,0	70,3 $\pm$ 4,1	16,7 $\pm$ 4,4*
2,2	52,0 $\pm$ 4,1	-

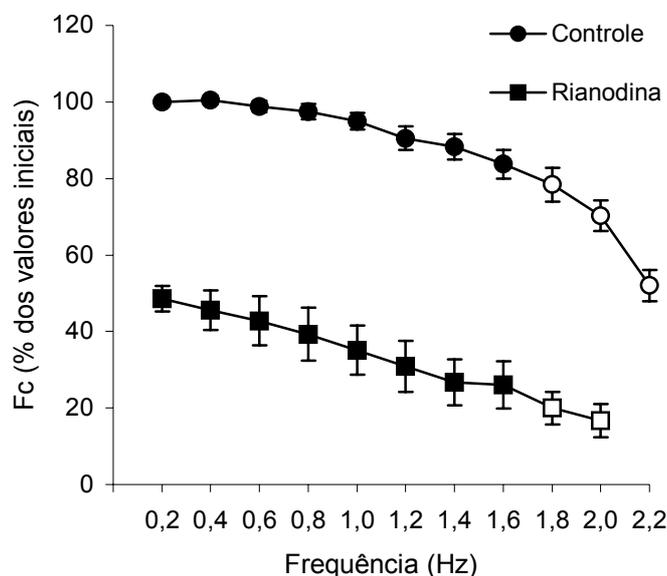


FIGURA 15. Efeito de aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) sobre a força de contração (Fc – % dos valores iniciais) desenvolvida pelos anéis ventriculares de curimatá, em preparações controle e após tratamento com 10  $\mu$ M de rianodina (n = 10), na temperatura de 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (p < 0,05).

### c) 25° C versus 35° C

A tabela 10 apresenta os valores médios ( $\pm$  E. P.M) da força de contração (Fc - % dos valores iniciais) desenvolvidos pelos anéis ventriculares de curimatá a 25° C (n = 10) e 35° C (n = 10) frente a incrementos na frequência de estimulação. Essas variáveis também estão representadas graficamente na figura 16.

Os resultados apresentados evidenciam que a elevação na temperatura de 25° C para 35° C provoca uma redução significativa da força já na menor frequência (0,2 Hz) de estimulação que se mantém em todas as frequências subseqüentes.

A 25° C, a Fc sofreu uma progressiva redução durante os incrementos na frequência, tornando-se significativa a partir de 1,0 Hz (60 bpm). O mesmo padrão de resposta foi observado a 35° C, porém a redução significativa na força foi ocorreu a 0,6 Hz (36 bpm). Ao observar-se a tabela 10 verifica-se que, na temperatura de 25° C, nessa frequência (1,0Hz), a redução na força foi de ~ 40%. Os menores valores médios de força encontrados a 25° C foi a 1,8 Hz (120bpm) (tabela 10) foram ~ 23 % que corresponde a uma redução de ~ 77% na força. A partir dessa frequência os registros tornaram-se irregulares e foram interrompidos. A 35 °C, a redução na força foi de ~ 7 % a 0,6Hz e os menores valores foram (8 %) observados a 2,0Hz (132bpm), que correspondem a uma redução de ~23 %.

### d) 25° C versus 35° C – Rianodina

A tabela 10 apresenta os valores médios da força de contração (Fc - % dos valores iniciais) desenvolvidos pelos anéis ventriculares de curimatá a 25° C (n = 10) e 35° C (n = 10) com a adição de 10  $\mu$ M de rianodina frente a incrementos na frequência de estimulação. Essas variáveis também se encontram representadas graficamente na figura 17.

O aumento na frequência de estimulação promoveu redução progressiva na Fc em ambas as temperaturas.

A 25° C, a redução da força mostrou-se significava a partir da frequência de 1.0 Hz (60bpm), o valor médio da força desenvolvida foi de ~ 59 %, que representa uma redução de ~ 41%. Os valores médios da menor força desenvolvida foram observados a 2,0 Hz (29,2%), uma redução de ~ 61 % em relação ao valores iniciais.

Quando se analisa o protocolo desenvolvido a 35° C, nota-se que a redução na Fc torna-se significativa na frequência de 1,2 Hz e equivale a ~ 24% , já que a força

desenvolvida foi de 43,8 %. Os menores valores de força, nessa temperatura (~ 17 %), foram também observados a 2,0 Hz. Estes valores correspondem a uma redução de ~ 50% em relação aos valores iniciais.

Nas menores frequências (0,2 e 0,4) de estimulação foram constatados maiores reduções no desenvolvimento de força a 35° C, sendo, significativamente, diferente dos valores observados a 25° C. No entanto, com o aumento na frequência de estimulação essa diferença desapareceu.

A partir da frequência 2,0 Hz, os registros tornaram-se irregulares em ambas as temperaturas e foram interrompidos.

TABELA 10. Valores da força de contração ( $F_c$  – % dos valores iniciais das preparações controle a 25° C) dos anéis ventriculares de curimatá, em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações controle ( $n = 10$ ) e após tratamento com 10  $\mu\text{M}$  de rianodina ( $n = 10$ ), nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os valores obtidos a 25° C e 35° C numa mesma frequência ( $p < 0,05$ ).

Frequência (Hz)	Controle		Rianodina	
	25° C	35° C	25° C	35° C
0,2	100,0 $\pm$ 0,0	31,1 $\pm$ 1,3*	87,5 $\pm$ 12,5	67,5 $\pm$ 9,8*
0,4	91,7 $\pm$ 1,5	27,6 $\pm$ 2,1*	80,0 $\pm$ 12,1	66,9 $\pm$ 9,8*
0,6	80,3 $\pm$ 1,7	24,6 $\pm$ 2,4*	73,1 $\pm$ 12,1	62,7 $\pm$ 9,5
0,8	70,4 $\pm$ 1,9	21,0 $\pm$ 2,9*	66,4 $\pm$ 12,0	56,7 $\pm$ 8,9
1,0	61,6 $\pm$ 1,9	17,9 $\pm$ 3,4*	58,9 $\pm$ 10,9	51,1 $\pm$ 8,5
1,2	46,8 $\pm$ 2,5	15,5 $\pm$ 3,7*	52,2 $\pm$ 10,9	43,8 $\pm$ 7,6
1,4	35,4 $\pm$ 2,4	13,7 $\pm$ 4,0*	45,3 $\pm$ 9,6	37,1 $\pm$ 7,0
1,6	26,3 $\pm$ 2,3	10,3 $\pm$ 4,2*	41,1 $\pm$ 9,7	29,2 $\pm$ 5,7
1,8	23,3 $\pm$ 3,2	8,3 $\pm$ 4,2*	32,3 $\pm$ 6,8	21,9 $\pm$ 4,8
2,0	-	-	26,2 $\pm$ 6,6	17,0 $\pm$ 4,0

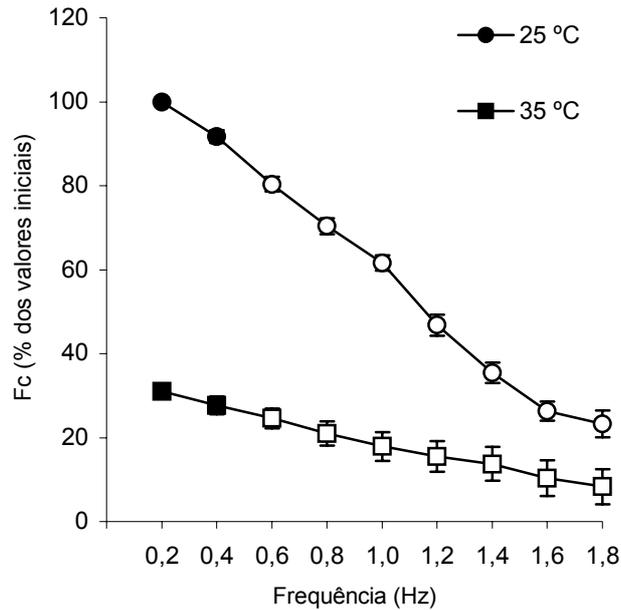


FIGURA 16. Efeito da temperatura sobre a força de contração (Fc – % dos valores iniciais) dos anéis ventriculares de curimatá, em preparações controle ( $n = 10$ ) durante aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz). Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

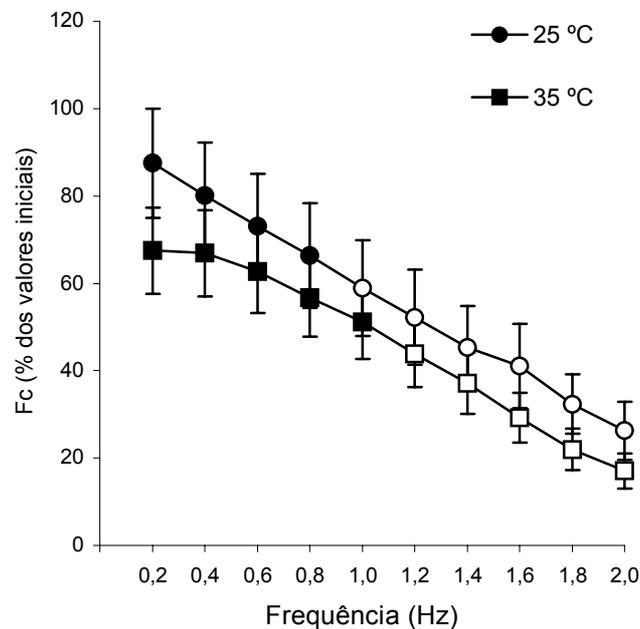


FIGURA 17. Efeito da temperatura sobre a força de contração (Fc – % dos valores iniciais) dos anéis ventriculares de curimatá, em preparações tratadas com  $10 \mu\text{M}$  de rianodina ( $n = 10$ ) durante aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz). Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.5.7. Tensão de Repouso

Os efeitos de incrementos sucessivos na frequência de estimulação imposta sobre os anéis ventriculares de curimbatá a 25° C (n = 10) e 35° C (n = 10) (preparações controle) e com a adição de 10 µM (n = 10) sobre o desenvolvimento de tensão de repouso (RT - % dos valores iniciais) estão apresentados na tabela 11. Esses valores também estão representados graficamente na figura 18.

Em todos os experimentos foi constatado o desenvolvimento progressivo de tensão de repouso, este se tornou significativo ( $p < 0,05$ ) a partir da frequência de 1,2 Hz para as preparações a 25° C e 35° C (controle), já nas preparações com rianodina o desenvolvimento de tensão de repouso tornou-se significativo ( $p < 0,05$ ) a partir de 1,6 Hz a 25° C e 1,4 Hz a 35° C.

Não foi observado diferença significativa entre os diferentes protocolos para frequências correspondentes.

TABELA 11. Valores da tensão de repouso (RT – % dos valores iniciais) das anéis ventriculares de curimatá, em resposta a aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) nas preparações controle (n = 10) e após tratamento com 10  $\mu$ M de rianodina (n = 10), nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M.

Frequência (Hz)	25° C		35° C	
	Controle	Rianodina	Controle	Rianodina
0,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
0,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,3
0,6	0,6 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6
0,8	1,7 $\pm$ 0,9	0,9 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,4
1,0	5,5 $\pm$ 1,6	1,7 $\pm$ 0,3	5,9 $\pm$ 1,3	5,8 $\pm$ 0,3
1,2	10,2 $\pm$ 2,9	4,1 $\pm$ 1,1	9,3 $\pm$ 1,1	9,1 $\pm$ 0,8
1,4	11,6 $\pm$ 3,4	7,8 $\pm$ 1,4	13,1 $\pm$ 1,3	12,5 $\pm$ 1,6
1,6	15,0 $\pm$ 3,0	14,8 $\pm$ 2,1	18,8 $\pm$ 1,3	17,6 $\pm$ 2,4
1,8	20,6 $\pm$ 3,0	22,2 $\pm$ 2,9	25,2 $\pm$ 1,5	23,2 $\pm$ 2,0
2		35,8 $\pm$ 3,9	35,8 $\pm$ 2,1	33,7 $\pm$ 2,5
2,2			40,5 $\pm$ 2,8	

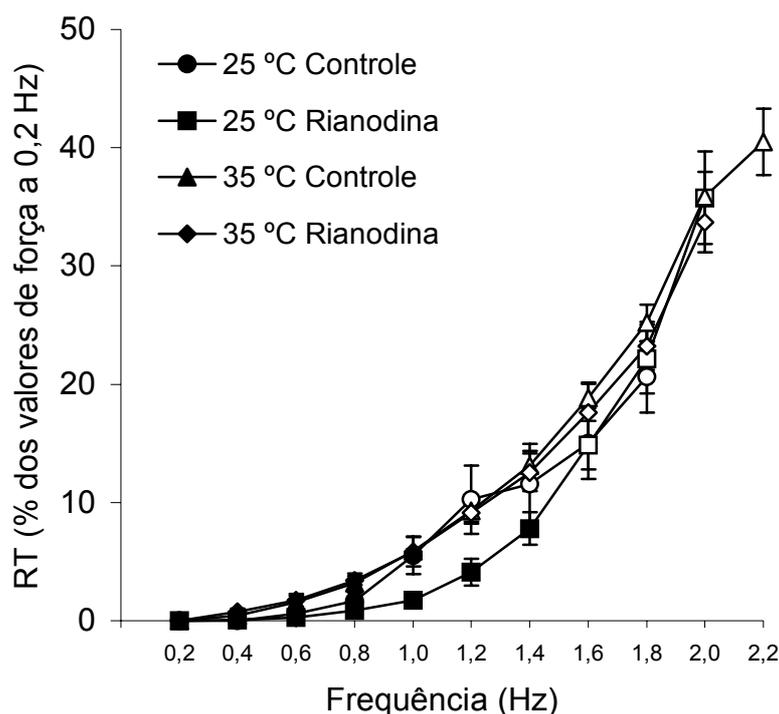


FIGURA 18. Efeito de aumentos sucessivos na frequência de estimulação (Hz) sobre a tensão de repouso (RT – % dos valores de força a 0,2 Hz) dos anéis ventriculares de curimatá, em preparações controle (n = 10) e após tratamento com 10  $\mu$ M de rianodina (n = 10), nas temperaturas de 25° C e 35° C. Valores médios  $\pm$  E.P.M. Os símbolos em branco indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Como enfatizado anteriormente, animais ectotérmicos tais como os peixes estão sujeitos a grandes variações do meio ambiente, especialmente as térmicas.

*Prochilodus lineatus* é uma espécie de peixe de hábito migratório, o que permite sua exposição às variações sazonais na temperatura do meio, já que depende da dinâmica da correnteza fluvial para a desova que ocorre durante a elevação do nível da água (primavera-verão) (NAKATANI et al., 2001).

A variação da temperatura modifica a velocidade das reações enzimáticas, bem como transporte e a solubilidade dos gases. Enquanto o coeficiente de difusão do O<sub>2</sub> aumenta com as elevações da temperatura, sua solubilidade e a afinidade da hemoglobina por ele é diminuída. Variações térmicas, juntamente com modificações na pressão atmosférica, afetam diretamente a solubilidade dos gases. No caso do oxigênio, a uma pressão de 760 mmHg, 100% de umidade relativa e a uma temperatura de 0° C solubilizam-se 14,60 mg do gás por litro de água, enquanto que, nas mesmas condições, e a 30° C solubilizam-se apenas 7,59 mg de oxigênio por litro de água (ESTEVES, 1998).

O aumento na temperatura também culmina com o aumento na taxa metabólica (PELSTER, 1999) e favorece a extração de oxigênio do sangue pelos músculos esqueléticos (FARRELL, 2002). Assim, animais com metabolismo elevado necessitam de um maior aporte sanguíneo para suprir suas necessidades energéticas. Essas condições impõem demandas sobre o sistema cardiovascular.

De acordo com MOYES (1996), quando o metabolismo é elevado cronicamente, o músculo cardíaco pode responder com adaptações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas. Durante o curso da adaptação podem surgir mudanças pronunciadas na ultraestrutura, na capacidade metabólica e na atividade enzimática. Nas mitocôndrias, tais mudanças podem incluir modificações no conteúdo enzimático ou alterações estruturais modestas. Entretanto, as mudanças na demanda metabólica podem ser agudas, resultantes de atividade física como ocorre durante a migração, durante a fuga de predadores ou na busca pelo alimento.

Para a manutenção de um débito cardíaco adequado durante alterações metabólicas, o sistema cardiovascular pode lançar mão de ajustes tanto no volume sistólico, por meio de alterações na força de contração isométrica, quanto na frequência cardíaca.

#### 4.1. Frequência cardíaca *in vivo*.

Mudanças agudas na temperatura podem influenciar tanto a frequência cardíaca ( $f_H$ ), quanto o volume sistólico com a finalidade de manter o débito cardíaco satisfatório (BLANK et al., 2002).

Segundo FARRELL & JONES (1992), a regulação do débito cardíaco, na maioria dos peixes teleósteos de ambiente temperado, é mediada, principalmente, por alterações no volume sistólico em vez de ser controlada pela frequência cardíaca ( $f_H$ ). Essa regulação do débito cardíaco por alterações no volume sistólico foi demonstrada nos experimentos desenvolvidos por MERCIER et al. (2002), em truta-marrom, *Salmo trutta*, em que elevações na temperatura de 14° C para 18° C não promoveram alterações significativas na  $f_H$  (78,2 para 82,0), enquanto que o volume sistólico teve um aumento de 1,03 para 1,22 mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. Segundo estes pesquisadores, essa elevação no volume sistólico foi responsável pelo aumento significativo no débito cardíaco de  $76,5 \pm 7,6$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para  $91,5 \pm 9,0$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> que apresentou um  $Q_{10}$  de 1,6.

Algumas espécies de peixes podem também lançar mão dos ajustes no volume sistólico para promover elevações no débito cardíaco durante o exercício sob baixas temperaturas. Nos experimentos realizados por COOKE et al. (2003) com “largemouth bass”, *Micropterus salmonides*, “black crappie”, *Pomoxis nigromaculatus* e “white bass”, *Morone chrysops* a 3° C, foi constatado que em “white bass” as elevações no débito cardíaco ocorridas durante o exercício anaeróbico deram-se, principalmente, pelos incrementos no volume sistólico. Já os incrementos no débito cardíaco observados em “largemouth bass” e “black crappie” ocorreram às custas de incrementos na frequência cardíaca.

Por outro lado, RANDALL (1968) sugere que, após elevações na temperatura, o volume sistólico em peixes seja aumentado exclusivamente por elevações na  $f_H$ , resultado do aumento da permeabilidade da membrana das células marcapasso e, conseqüentemente, da elevação de sua taxa intrínseca de despolarização. Um exemplo desse tipo de regulação foi descrito por BLANK et al. (2002) para o atum de nadadeira amarela, *Thunnus albacaris*, cuja  $f_H$  aumentou de 20 para 109 bpm quando a temperatura foi elevada de 10 para 25° C, enquanto que o volume sistólico sofreu redução de 1,4 para 0,9 mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> durante a elevação da temperatura de 15° C para 25° C.

Esse mesmo padrão foi observado para a perca “spangled” *Leipotherapon unicolor*, uma espécie também de clima temperado, em que a elevação na temperatura de 5° C para 35° C promoveu incrementos na frequência cardíaca de 12,2 para 104,11 apresentado um  $Q_{10}$  de 2,85 (GEHRKE & FIELDER, 1998).

O mesmo padrão de resposta foi observado por alguns autores para peixes tropicais. ANELLI-JR et al. (2004), trabalhando com o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, observaram que a elevação da temperatura de 25° C para 35° C elevou a frequência cardíaca de 30 bpm para cerca de 115 bpm, com um valor de  $Q_{10}$  de aproximadamente 3. Outros autores encontraram a mesma tendência durante elevações da temperatura de 25° C para 35° C, como descrito por OLLE (2003) para a traíra, *Hoplias malabaricus*, que elevou a  $f_H$  de 36 bpm para 104 bpm ( $Q_{10} = 2,9$ ), por COSTA et al. (2000) para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, cuja  $f_H$  aumentou de 34 bpm para 87 bpm ( $Q_{10} = 2,6$ ) e por COSTA et al. (2004) para o dipnóico pulmonado pirambóia, *Lepidosiren paradoxa*, em que a  $f_H$  aumentou de 31 para 70 bpm ( $Q_{10}$  de 2,2).

Os resultados acima estão de acordo com os encontrados no presente estudo para o curimatá, em que a elevação na temperatura de 25° C para 35° C promoveu uma resposta cronotrópica positiva. A  $f_H$  média apresentada na temperatura de aclimação (25° C) foi de  $49,3 \pm 3,7$  bpm e a 35° C foi  $117,8 \pm 5,6$  bpm, com  $Q_{10}$  de 2,3. A  $f_H$  recuperou os valores iniciais com o retorno à temperatura de aclimação, indicando que esta espécie está adaptada a enfrentar variações agudas na temperatura do meio, tais como as impostas neste trabalho.

De acordo com DRIEDZIC & GESSER (1994), a  $f_H$  de peixes teleósteos varia de 10 a 60 bpm, geralmente não excedendo 120 bpm. No entanto, alterações na temperatura podem modificar esse padrão, como observado no atum, *T. albacaris*, que apresenta uma  $f_H$  de 20 bpm a 10° C e de 109 bpm a 25° C (BLANK et al., 2002). O amorê de poça de maré, *Bathygobius soporator*, também é uma exceção, apresentando valores de  $f_H$  de repouso de ~140 bpm a 25° C e 230 bpm a 35° C (RANTIN et al., 1998).

Além disso, o nível de atividade da espécie também tem conseqüências sobre a  $f_H$ . Peixes muito ativos como o atum “skipjack”, *Katsuwonus pelamis*, apresentam uma  $f_H$  de repouso de 120 bpm, podendo elevar a mesma para 200 bpm quando em exercício (KEEN et al., 1992). Os resultados do presente estudo indicam que a  $f_H$  de curimatá (49 bpm a 25° C e 115 bpm a 35° C) encontra-se entre as frequências típicas desenvolvidas por teleósteos, sugerindo que os aumentos na  $f_H$  seja um mecanismo

eficiente para a adaptação a elevações na temperatura e contribuir para a manutenção de um débito cardíaco adequando perante as modificações impostas pelo ambiente.

Em vertebrados, a  $f_H$  é controlada por fatores intrínsecos (auto-despolarização das células marca-passo que, nos peixes, geralmente localizam-se no seio venoso), autonômicos e humorais. A interação desses mecanismos efetores é espécie-específica e temperatura-dependente (FARRELL & JONES, 1992).

A temperatura afeta a velocidade de despolarização das células marca-passo (HAPER et al., 1995), e o potencial de ação cardíaco é encurtado por incrementos na temperatura. Tal evento foi descrito por AGUIAR et al. (2002) para *Piaractus mesopotamicus*, cuja duração do potencial de ação ventricular ( $V_{APD}$ ) diminuiu de 492 ms para 261 ms quando a temperatura foi elevada de 25° C para 35° C. A diminuição do  $V_{APD}$  contribuiu para os aumentos na  $f_H$  (de 26 bpm para 108 bpm) observados durante tal elevação térmica. A figura 19 ilustra os efeitos da elevação da temperatura sobre o potencial de ação em miócitos ventriculares de trutas.

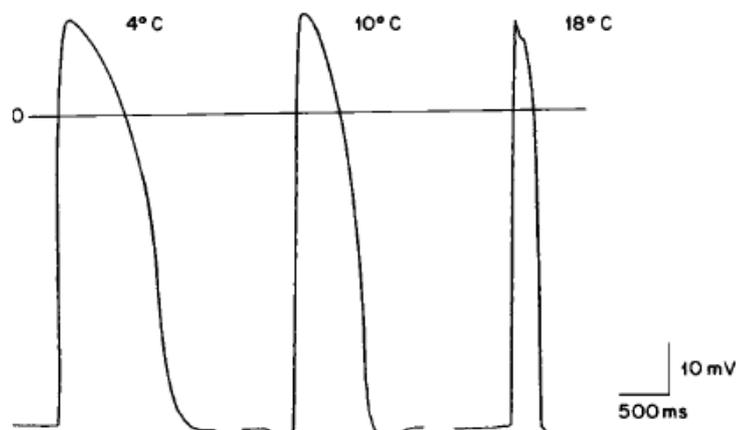


FIGURA 19. Efeito da elevação da temperatura sobre o potencial de ação dos miócitos ventriculares de truta (COYNE et al., 2000).

O sistema nervoso autônomo é um dos mais importantes moduladores da  $f_H$  nos vertebrados. Em vertebrados inferiores há uma grande variação no padrão de inervação autonômica cardíaca.

Segundo FRITSCHÉ (1993), os peixes teleósteos apresentam uma dupla inervação antagonista (simpática e parassimpática) com exceção dos pleuronectídeos (linguados), que não possuem inervação simpática. Porém, esse grupo apresenta tecido cromafim na região cardíaca, implicando em um controle adrenérgico. Caso semelhante é visto nos ciclóstomos que apesar de não possuírem inervação cardíaca extrínseca, apresentam estoques de catecolaminas no coração. Os dipnóicos apresentam inervação vagal cardíaca, mas carecem de inervação excitatória, cuja função é desempenhada pelos estoques de catecolaminas cardíacos.

A ativação do sistema colinérgico resulta em cronotropismo negativo, sendo esse efeito inibitório devido à diminuição na taxa de despolarização das células marca-passo (PELSTER, et al., 1993). Animais aclimatados ao frio possuem maior tônus colinérgico comparados com aqueles aclimatados ao calor. Por outro lado, a inervação adrenérgica promove cronotropismo positivo (FARRELL & JONES 1992).

Ao chegar no tecido cardíaco, via circulação sanguínea, a adrenalina liga-se a receptores do tipo  $\beta$ , aumentando a permeabilidade das membranas das células marcapasso ao  $\text{Na}^+$ . Tal aumento da permeabilidade da membrana ao  $\text{Na}^+$  provoca um potencial de repouso mais positivo e menor tempo para atingir o limiar para a auto-excitação, o que facilita a despolarização e a condução do impulso nervoso, levando a aumentos na  $f_H$  (GUYTON & HALL, 2002).

Além disso, o cronotropismo positivo causado pelas catecolaminas pode resultar da ativação dos processos transportadores de cálcio que viabilizam um relaxamento mais rápido, (VORNANEN, 1989) e da diminuição da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  por meio da fosforilação da troponina I via AMPc, aumentando a taxa de desligamento deste íon da troponina C (BERS, 1991).

Nos teleósteos, apesar de eles possuírem uma inervação adrenérgica bem caracterizada com agonistas, tais como a adrenalina e noradrenalina, os quais causam incrementos na frequência cardíaca e na contratilidade cardíaca, geralmente, o tônus vagal é predominante. Outros vertebrados inferiores exibem características semelhantes. Estudos do efeito da alteração da temperatura sobre a função cardíaca do anfíbio *Xenopus laevis* revelaram que o tônus vagal é extremamente sensível a elevações na temperatura. Isso pôde ser observado por meio da adição de atropina (um bloqueador do tônus vagal), que promoveu aumentos na frequência cardíaca a de 6 bpm para 22 bpm a 5° C, 9 bpm para 35 bpm a 15 °C e de 12 bpm para 70 bpm a 25° C (TAYLOR & IHMIED, 1995).

Segundo FARRELL et al. (1996), o estudo exclusivo da  $f_H$  não é suficiente para elucidar os mecanismos de ajustes cardiovasculares em função de modificações na temperatura. Sendo assim, torna-se imprescindível o estudo das respostas inotrópicas da espécie por meio da mensuração da força de contração isométrica dos anéis ventriculares submetidos a alterações da temperatura por meio de estudos *in vitro*.

## **4.2. Músculo cardíaco isolado.**

### **4.2.1. Efeito da elevação da temperatura sobre a força de contração e parâmetros tempo-dependentes.**

A mensuração da força tem sido utilizada por muitos pesquisadores para estudos da contratilidade cardíaca. Estudos mais recentes têm utilizado este dado para elucidar os processos do acoplamento excitação-contração em diferentes espécies, inclusive em peixes (VASSALO et al., 1994; RANTIN et al., 1998; ANELLI-JR et al. 2004), bem como em algumas condições patológicas experimentais (SATO et al., 2001) e investigações farmacológicas (BAUDET & NOIREAUD, 1999).

Nos vertebrados, a força de contração isométrica é gerada pela interação entre os miofilamentos contráteis cardíacos. Essa interação, no entanto, é dependente do aumento na concentração citosólica de cálcio (cálcio ativador) (KATZ, 1997).

As elevações nas concentrações citosólicas de  $Ca^{2+}$  são desencadeadas pela excitação elétrica da membrana plasmática, e permite o rápido influxo do íon proveniente do meio extracelular para o interior do miócito (VORNANEN, et al., 2002). Esse influxo de  $Ca^{2+}$  ocorre durante a fase de despolarização do potencial de ação cardíaco, o que contribui para o desenvolvimento do platô (BERS, 2002).

Na maioria dos peixes, incluindo os teleósteos, apesar do RS também contribuir com cálcio para o acoplamento excitação-contração, a principal fonte de cálcio ativador é o meio extracelular. Semelhante ao observado nos mamíferos o cálcio entra nos miócitos principalmente através dos canais L. Porém o NCX, atuando no estado reverso, também exerce função muito importante no fornecimento de  $Ca^{2+}$  ao aparato contrátil (FARRELL et al., 2003).

Para o relaxamento muscular é necessário que o cálcio seja removido do citosol de maneira a atingir os níveis diastólicos de repouso. Isso se dá pelo transporte do íon para o espaço extracelular via NCX (3 íons  $Na^+$  por íon  $Ca^{2+}$ ), bomba de cálcio ATP-dependente ou pelo seu bombeamento ativo para o interior do RS pela ação da bomba

cálcio ATP-dependente do retículo sarcoplasmático (SERCA) (FARRELL et al., 2003). A figura 20 esquematiza tais eventos para maior entendimento.

O grau de participação dos diferentes mecanismos citados acima pode variar em diferentes espécies. A importância do RS no ciclo excitação-contração cardíaco varia entre as diferentes classes de vertebrados, entre diferentes espécies dentro do mesmo grupo filogenético e durante a ontogênese do desenvolvimento individual (AHO & VORNANEN, 1998).

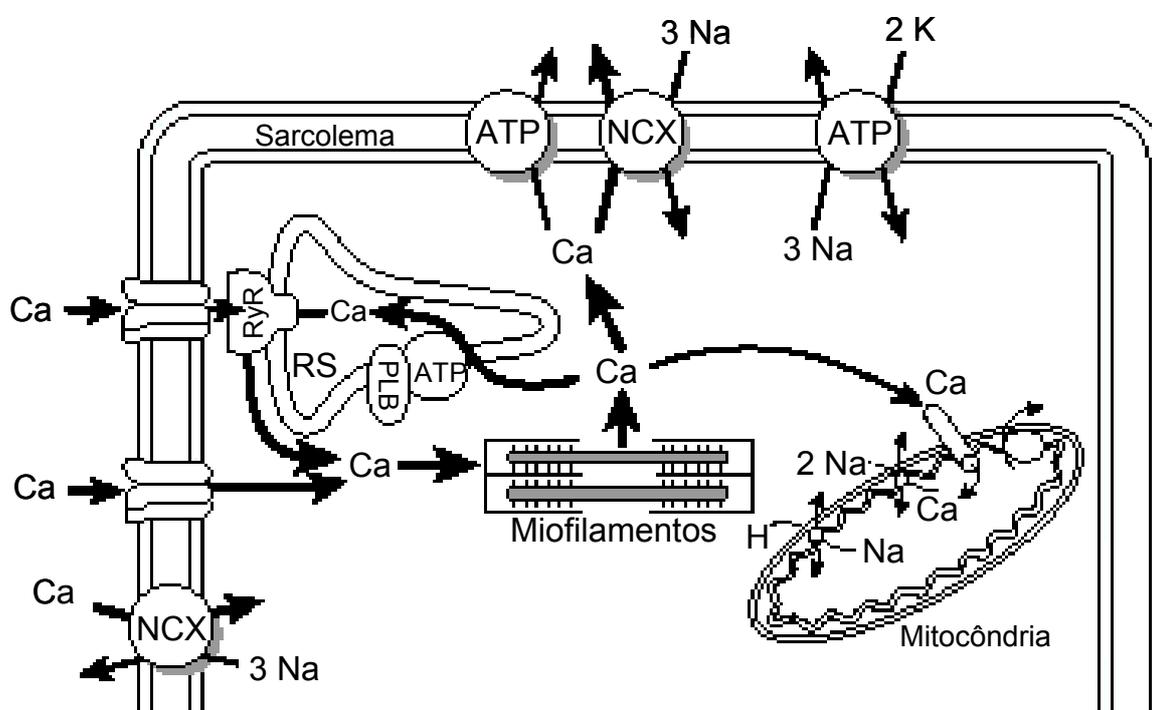


FIGURA 20. Esquema demonstrando os mecanismos que promovem a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e sua extrusão do citosol em miócitos ventriculares (adaptada de BERS, 2002).

Em sua revisão, BERS (2002) mostra que nos miócitos ventriculares de coelhos, 70% do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático é removido pela SERCA, 28 % pelo NCX e os 2 % restantes, pelos chamados sistemas lentos, que incluem as mitocôndrias e a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-dependente da sarcolema. Já em ratos, 92% do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático é seqüestrado pela SERCA, enquanto que o NCX é responsável pela extrusão de 7% e os sistemas lentos removem apenas em torno de 1% desse cálcio citoplasmático.

Em estudo comparando a atividade da SERCA dos miócitos ventriculares de mamíferos e teleósteos, AHO & VORNANEN (1998) verificaram que as taxas relativas de tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (quando corrigidas pela temperatura corpórea do animal) foram de 100, 26, 19, 18, 11 e 2% para ratos adultos, ratos neonatos, trutas aclimatadas ao frio, trutas aclimatadas ao calor, carpas-crucianas aclimatadas ao frio e carpas-crucianas aclimatadas ao calor, respectivamente. Tais resultados mostraram que a tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS para o relaxamento é mais lenta em peixes que em mamíferos e que existe uma marcada diferença espécie-específica entre os teleósteos.

A velocidade das reações enzimáticas depende de variações na temperatura corpórea e repercute diretamente no desenvolvimento da força isométrica ( $F_c$ ). Em animais endotérmicos, o aumento no metabolismo promove aumentos na temperatura corporal, os quais culminaram com elevações nas taxas enzimáticas. Nos animais ectotérmicos, a situação parece mais complicada, já que os mesmos estão sujeitos a variações impostas pelo ambiente.

Mudanças na temperatura do ambiente têm um grande efeito sobre a contratilidade cardíaca de peixes. Aumentos na temperatura que, geralmente, promovem incrementos na  $f_H$  e na velocidade de contração também podem, concomitantemente, reduzir a força contrátil. Geralmente, a capacidade de bombeamento cardíaco desses animais é diminuída em temperaturas extremas e otimizada na temperatura corporal fisiológica (VORNANEN et al., 2002). Os peixes devem, então, lançar mão de mecanismos adaptativos que lhes permita manter seu débito cardíaco frente às modificações na temperatura para garantir sua sobrevivência. (VORNANEN et al., 2002). Esses mecanismos estão relacionados ao grau de dependência térmica dos mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contração. Segundo COSTA (2003), existem importantes diferenças em relação à dependência térmica destes mecanismos.

Nos mamíferos, tem-se demonstrado que a atividade do trocador NCX de miócitos apresenta diferenças interespecíficas. Tais diferenças refletem, provavelmente, as diferenças na densidade, regulação e/ou na relação espacial entre o trocador e os canais de rianodina do RS (MAHONY, 1996).

Quando comparada com mamíferos, a atividade do NCX de peixes apresenta baixa dependência em relação à temperatura (XUE et al., 1999; ELIAS et al., 2001).

De acordo com VORNANEN et al. (2002), a dependência térmica do NCX e da SERCA em peixes apresenta  $Q_{10}$  de 1,5 e 1,6, respectivamente, sendo bem menor que aquela apresentada pelos mamíferos. Em mamíferos, a dependência térmica do NCX

apresenta um  $Q_{10}$  de 2,2 - 4,0 (KIMURA et al., 1987; HILGEMANN et al., 1992). A diferença entre a dependência da temperatura entre as isoformas do NCX entre mamíferos e teleósteos são, provavelmente, devido a diferenças em suas estruturas primárias (ELIAS et al., 2001). Já a atividade dos canais L apresenta valores de  $Q_{10}$  maiores que 2 em peixes enquanto que a de mamíferos fica em torno de 3.

Segundo GAMPERL & FARRELL (2004), os canais tipo L de mamíferos e, surpreendentemente, de trutas é extremamente sensível à temperatura, apresentado um  $Q_{10}$  de 1,8 a 2,1 durante as mudanças agudas na temperatura.

SHIELS et al. (2000) estudaram a dependência térmica dos canais L de miócitos atriais de truta arco-íris. Os peixes foram aclimatados a 14° C e a elevação da temperatura para 21° C causou um aumento no influxo de  $Ca^{2+}$  via canais L ( $Q_{10}$  1,9), enquanto que a redução para 7° C resultou em redução em tal influxo ( $Q_{10}$  2,1). Segundo os autores, embora a dependência térmica dos canais L apresentada por trutas não seja grande como aquela observada na maioria dos mamíferos, este mecanismo sozinho raramente poderia ser responsável pela tolerância à temperatura observada em peixes na natureza.

Assim, outros mecanismos reguladores da contratilidade cardíaca nos peixes poderiam ajudar a conferir a relativa tolerância térmica observada em trutas. Dessa maneira, os autores inferem que modificações no potencial de ação são críticas na determinação do transporte de  $Ca^{2+}$  através da sarcolema.

Como já discutido, os aumentos na temperatura geralmente promovem diminuição na Fc, em muitas espécies de teleósteos já estudadas (KEEN et al., 1994; HOVE-MADSEM, 1992). Essa assertiva pode ser exemplificada pelos estudos desenvolvidos por COSTA et al. (2000) com tilápia do Nilo. Esta espécie sofreu uma redução de aproximadamente 80% na força desenvolvida pelas anéis ventriculares quando a temperatura foi elevada de 25° C para 35° C e 40° C. Esses resultados vêm ao encontro dos observados no presente estudo, cuja a análise estatística revelou reduções significativas entre os valores iniciais e finais da força de contração dos anéis ventriculares do curimatá, quando a temperatura foi elevada de 25° C para 35° C.

Por outro lado, nos experimentos realizados por ANELLI-JR et al. (2004) e OLLE (2003), com anéis ventriculares de pacu e traíra, respectivamente, e por COYNE et al. (2000) com truta, alterações na temperatura não promoveram modificações na força isométrica desenvolvida. Do mesmo modo, anéis ventriculares de tartaruga

também não apresentaram modificação na força de contração quando a temperatura foi elevada de 10° C para 20° C (SHI & JACKSON, 1997).

Estudos recentes demonstram que em algumas espécies a força pode, inclusive, aumentar perante elevações na temperatura, como em pirambóia, uma espécie adaptada a temperaturas elevadas (COSTA et al., 2003). Este animal apresentou inotropismo positivo frente a incremento na temperatura do meio de 25° C para 35° C. Segundo a autora, essa resposta pode representar um mecanismo compensatório útil para a manutenção do débito cardíaco, já que a frequência cardíaca *in vivo* deste animal também foi aumentada com elevações na temperatura.

Segundo SHIELS et al. (2000), tanto o influxo de  $Ca^{2+}$  através da sarcolema, quanto a sua tomada e liberação pelo RS são alterados pela temperatura em miócitos atriais de truta. Tais alterações causam mudanças significativas nos parâmetros tempo-dependentes da contratilidade miocárdica.

No presente trabalho, a análise dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) teve como objetivo a compressão das causas que levaram à redução da força de contração, pois fornecem informações sobre o estado ativo do músculo. A elevação gradual na temperatura promoveu redução significativa tanto de TPT, quanto de THR a partir de 30° C, que atingiram os menores valores em 35° C.

A diminuição no tempo de relaxamento poderia ser explicada por uma alta atividade da SERCA em elevadas temperaturas, como demonstrado por BAILEY & DRIEDZIC (1990). Alternativamente, a alta atividade do NXC também poderia explicar essa resposta, já que este também aumenta sua atividade com elevações da temperatura, como já comentado anteriormente. Esses fatores poderiam ainda estar atuando de maneira sinérgica.

COYNE et al. (2000) estudaram a contratilidade miocárdica de trutas a 4, 10 e 18° C e verificaram que, embora a temperatura não tenha alterado significativamente o desenvolvimento de força, o TPT e o THR foram prolongados a 4° C e encurtados a 18° C. Esses pesquisadores verificaram que baixas temperaturas promoveram modificações nas taxas de entrada e remoção do cálcio via RS. O frio promoveu aumentos na liberação do cálcio pelo RS através dos canais de rianodina e diminuição na atividade da SERCA. Os autores sugerem que provavelmente esse mecanismo seja responsável pelos aumentos observados no THR nas temperaturas mais baixas. Dessa maneira, o incremento de cálcio, via canais de rianodina, balanceado pela redução no influxo de cálcio através dos canais da sarcolema e a diminuição na tomada de  $Ca^{2+}$  do

citósol, via retículo sarcoplasmático estariam promovendo prolongamento no estado ativo do músculo, repercutindo em elevações do TPT e THR. Assim, o contrário poderia ser verdadeiro para explicar as reduções no TPT e THR observadas no presente estudo em elevadas temperaturas. Reduções nos parâmetros tempo-dependentes em função de elevações na temperatura também foram registrados para os anéis ventriculares de pirambóia (COSTA, 2003), traíra (OLLE, 2003) e pacu (ANELLI-JR et al., 2004).

O aumento na temperatura poderia ainda estar encurtando o potencial de ação. De acordo com MARICONDI-MASSARI et al. (1998) e AGUIAR et al. (2002), elevações na temperatura causaram encurtamentos na duração do potencial de ação ventricular ( $V_{APD}$ ) de tilápia-do-nilo e pacu, respectivamente. Tal padrão de resposta já havia sido descrito para mamíferos (SHATTOCK & BERS, 1987) e linguados (LENNARD & HUDDART, 1990), sugerindo que a elevação da temperatura acelera a difusão iônica através da sarcolema e, conseqüentemente, a despolarização final.

O influxo do  $Ca^{2+}$  tanto através dos canais L, quando via NCX é extremamente dependente da fase do potencial de ação, especialmente do aumento e duração do platô. Essa fase é tecido-específica e temperatura-dependente. O influxo de potássio ( $K^+$ ) é o principal responsável pela repolarização das células marca-passo. Em trutas aclimatadas a 4° C, a atividade dos canais de  $K^+$  é modificada, promovendo uma redução do influxo deste íon e prolongando a fase de platô, o que pode afetar o transporte de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependente e, conseqüentemente, o acoplamento E-C (VORNANEN et al., 2002).

Analisando o comportamento de TPT e THR, pode-se inferir que a redução do estado ativo do músculo é que causou a redução observada na força de contração frente às elevações na temperatura. Todavia, o menor estado ativo do músculo também permite que o mesmo se contraia a maiores freqüências em temperaturas elevadas, como pôde ser observado nos experimentos *in vivo*, no presente trabalho. Esse assunto será discutido, com maiores detalhes, quando da análise dos efeitos dos incrementos na freqüência de estimulação.

É importante salientar que a maioria dos estudos desenvolvidos com variações de temperatura e aclimação foram realizados com peixes de ambientes temperados, dando-se maior atenção às baixas temperaturas.

#### 4.2.2. Efeito da elevação na concentração de cálcio extracelular sobre o desenvolvimento de força e parâmetros tempo-dependentes a 25° C e 35° C.

A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular livre é crucial para regular os processos de contração e relaxamento musculares em miócitos cardíacos.

A geração de força em qualquer fibra muscular estriada depende do grau de interação entre os miofilamentos contráteis (actina e miosina). Estes filamentos estabelecem ligações entre si, denominadas pontes cruzadas, as quais necessitam do  $\text{Ca}^{2+}$  para sua formação. O número de pontes cruzadas é que vai determinar o grau de geração de força. Portanto, a variação na disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  ao aparto contrátil é responsável pela modificação na força (GUYTON & HALL, 2002).

Em mamíferos, tanto em células musculares como nas demais, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citoplasma é de aproximadamente 20–50 nM. Este valor é  $10^3$ – $10^4$  vezes menor que a concentração deste íon encontrada no espaço extracelular ou no lúmen do RS, valores que, usualmente, atingem concentrações milimolares (0,1 – 2,0mM) (MARTONOSI & PIKULA, 2003).

Tem sido demonstrado que, na maioria das espécies de teleósteos, a principal fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador do processo de contração muscular é o meio extracelular (HOVE-MADSEN, 1992; RANTIN, et al., 1998; COSTA, 2000). No entanto, isso difere de acordo com a espécie, o hábito de vida do animal, temperatura e frequência cardíaca (SHIELS & FARRELL, 1997).

CHUGUN et al. (1999) desenvolveram um estudo com a finalidade de comparar os mecanismos de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS de miócitos de rato e carpa. Estudos morfométricos e estruturais por meio de microscopia eletrônica revelaram que o RS dos miócitos de carpa é pobremente desenvolvido, quando comparado com o de ratos. Além disso, após preparações que purificaram os receptores de rianodina de anéis ventriculares de ambos os animais, foi constatado que os miócitos de carpa possuem menos afinidade e menor número de sítios de ligação para o  $\text{Ca}^{2+}$ . Adicionalmente, uma concentração maior de  $\text{Ca}^{2+}$  foi requerida para causar metade de estimulação máxima de tais receptores em carpas.

A densidade de canais tipo L e de receptores de rianodina foi investigada por THOMAS et al. (1996) em homogenados ventriculares de rato, truta, cação e peixe-bruxa. A densidade de canais tipo L encontrada foi de 29 sítios por  $\mu\text{m}^3$  em rato, 18 sítios por  $\mu\text{m}^3$  em truta, 13 sítios por  $\mu\text{m}^3$  em cação e 2 sítios por  $\mu\text{m}^3$  em peixe-bruxa. Além disso, foram encontrados receptores de rianodina de alta e baixa afinidade para

todas as espécies estudadas. A densidade de receptores de rianodina de alta-afinidade foi 65 de sítios. $\mu\text{m}^{-3}$  em ratos, 21 sítios. $\mu\text{m}^{-3}$  em truta, 3 sítios. $\mu\text{m}^{-3}$  em cação e  $< 1$  sítio. $\mu\text{m}^{-3}$  em peixe-bruxa. A proporção RyR/DHPR em rato, truta, cação e peixe-bruxa foi de 2,2, 1,2, 0,2 e 0,5, respectivamente. Assim, parece haver uma relação decrescente entre a densidade de canais L (ou receptores DHPR) e receptores de rianodina (ou receptores RyR) e a posição filogenética desses animais (mamíferos, teleósteos, elasmobrânquios e ciclóstomos, respectivamente).

Evidências indiretas sugerem que sob condições fisiológicas adequadas (frequência cardíaca e temperatura), a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS nas fibras cardíacas da truta é extremamente pequena. Já em atuns (espécie mais ativa), a maior parte do cálcio ativador da contração muscular é proveniente de estoque do RS (VORNANEN et al., 2002). Um exemplo disso foi observado em miócitos atriais do atum de nadadeira amarela, em que adição de rianodina reduziu a força de contração em 50% e a taxa de relaxamento em 60%, indicando a presença de um RS funcional em temperaturas e frequências fisiológicas.

As principais vias para o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da sarcolema são os canais do tipo L e o trocador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  trabalhando em modo reverso. O aumento da disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular parece aumentar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sarcolema sem atuação de qualquer via de transdução de sinal (BAILEY & DRIEDZIC, 1990). Em miócitos ventriculares de ratos o aumento nas concentrações extracelulares de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  promoveu aumento nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente via trocador atingindo valores máximos em  $\sim 30$  segundos, demonstrando que a modificação nas concentrações iônicas do meio extracelular pode modificar a atividade deste transportador (fazendo com que o mesmo atue no modo reverso) (BAARTSCHEER, et al., 1996).

Dessa maneira, é de esperar-se que incrementos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular promovam efeito inotrópico positivo sobre a Fc de peixes teleósteos. De fato, esses resultados foram observados no presente estudo. Em ambas as temperaturas testadas, os incrementos de cálcio (1,25 a 11,25 mM) resultaram em um aumento da força de contração em  $\sim 90\%$  a  $25^\circ\text{C}$  e  $\sim 41\%$  a  $35^\circ\text{C}$ , indicando que esta espécie se beneficia do  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do meio extracelular no acoplamento excitação-contração. De acordo com DRIEDZIC & GESSER (1985), a força isométrica pode aumentar de 50 % a 500 %, dependendo da espécie, durante os incrementos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Segundo BERS (2002), existem duas maneiras de mudar a força de contração cardíaca: por meio de alterações na amplitude ou duração do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e pela modificação na sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ .

É provável que o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular seja modulado mais pelo estado de abertura dos canais, especialmente do canal do tipo L, que pela própria concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, pois esta, *in vivo*, raramente ultrapassa 1mM (AHO & VORNANEN, 1999). No entanto, é importante considerar-se que, apesar de elevadas concentrações de cálcio não serem encontradas no sangue em condições normais, estas poderiam ser desencadeadas pela liberação de adrenalina durante o estresse (ANELLI-JR, 2002). Isso pode ser evidenciado por meio da adição de adrenalina, um modulador dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, ao meio extracelular. A estimulação dos  $\beta_2$ -adrenoceptores pela adrenalina ativa, via AMPc, uma quinase A que provoca fosforilação dos canais L, aumentando sua condutância e, conseqüentemente, elevando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (VORNANEN, 1998; KAMP & HELL, 2000). Assim, de acordo com AHO & VORNANEN (1999), a adição deste agonista aumenta a força de contração isométrica cardíaca de teleósteos em cerca de 2 vezes, enquanto que a adição do antagonista verapamil diminui a força de 4 a 6 vezes, provavelmente, por diminuir a condutância dos canais L.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  seja responsável pela modulação da força de contração isométrica. Resultados semelhantes aos aqui apresentados, em relação à temperatura de 25° C, foram descritos por COSTA (2003) para pirambóia. Este animal também apresentou elevações na força de contração frente aos incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  em concentrações iguais ou superiores a 8,5 mM. Por outro lado, este mesmo animal, quando submetido a elevações nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  a 35° C, não apresentou nenhuma modificação significativa no desenvolvimento de força, diferentemente, do encontrado no presente estudo.

O muçum, *S. marmoratus*, não apresentou modificações perante incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  a 15° C e 25° C (ROCHA, 2004). Porém, a 35° C, este animal apresentou aumentos na força de contração já no primeiro incremento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (3,25 mM), observação esta que vai ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo para *o curimbatá*.

Nossos resultados deixam claro que a elevação da temperatura causa redução na força de contração como já foi discutido no item 4.2.1. O fato dos incrementos nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ter promovido elevações na força a 35° C enfatiza

que, nesta temperatura, a disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  está sendo limitante para o desenvolvimento de força. Deve-se considerar, também, que os mecanismos de transporte de cálcio transsarcolemais são sensíveis a modificações na temperatura, tornando-se ativos em temperaturas mais elevadas, reduzindo os parâmetros tempo-dependentes e a força de contração. No entanto, os incrementos de cálcio, no meio extracelular, estariam disponibilizando um maior número de íons para o processo e amenizando a queda na força em função das elevações na temperatura.

COSTA (1998) salienta que um aumento da força em resposta à elevação nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , em temperaturas mais elevadas, indicaria que o fornecimento deste íon constitui um passo crucial para obtenção de uma performance adequada ao aumentado demanda de  $\text{O}_2$  pelos diferentes sistemas.

Apesar de a força ter sido aumentada em função dos incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular, ela foi significativamente menor a  $35^\circ\text{C}$  quando comparada com o controle ( $25^\circ\text{C}$ ) em todas as concentrações testadas. Isso sugere que os transportadores sarcolemais já estariam trabalhando na sua capacidade máxima nesta temperatura. Além disso, a menor força observada a  $35^\circ\text{C}$  pode estar relacionada à ineficiência de outros mecanismos, e não ao fornecimento de  $\text{Ca}^{2+}$ , de maneira a permitir um desenvolvimento adequado de força em altas temperaturas.

BAYLEY & DRIEDZIC (1990), apontam que um aumento na contratilidade desencadeado pelo  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular pode corresponder a uma resposta de curta duração com o intuito de facilitar a performance cardíaca, quando um animal aclimatado a uma temperatura é exposto a uma temperatura mais elevada.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que os parâmetros tempo-dependentes apresentaram-se prolongados em proporção direta às elevações nas concentrações de cálcio (com exceção do THR a  $35^\circ\text{C}$ ). Sendo que os valores encontrados para  $35^\circ\text{C}$  são sempre menores que aqueles apresentados pelos controles.

O aumento no THR a  $25^\circ\text{C}$  provavelmente, deve-se ao fato de os mecanismos responsáveis pela extrusão deste íon não serem capazes de retirar o  $\text{Ca}^{2+}$  do sarcoplasma com a mesma velocidade que ele está entrando via canais sarcolemais. Assim, o músculo leva um tempo maior para relaxar. Isso não foi observado a  $35^\circ\text{C}$ , provavelmente, porque a atividade da SERCA é temperatura-dependente, sendo mais ativa em temperaturas mais altas e, então, o cálcio estaria sendo transportado para o RS mais rapidamente.

LADEIRA-FERNANDEZ et al. (2004) pesquisaram a dependência da temperatura da SERCA de três espécies de atuns, mensurando a absorção de  $\text{Ca}^{2+}$  em diferentes temperaturas (5-35° C). Estes pesquisadores concluíram que, embora existam diferenças interespecíficas, a tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS foi maior a 35° C em todas as espécies testadas, indicando que a atividade da SERCA é altamente dependente da temperatura. Essa maior atividade da SERCA promoveria um relaxamento mais rápido do miócito, encurtando o THR, o que também permitiria o desenvolvimento de uma taquicardia em temperaturas elevadas, como o observado no presente estudo e discutido no item 4.1.

Dados semelhantes a estes foram descritos por COYNE et al. (2000) para anéis ventriculares de truta a 4, 10 e 18° C. Os autores verificaram aumentos da força e reduções nos parâmetros tempo-dependentes na maior temperatura testada, frente a incrementos crescentes do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Outro fato que explicaria a manutenção do THR a 35° C seria o aumento do efluxo do  $\text{Ca}^{2+}$  para o espaço extracelular via NCX, pois a atividade do trocador também aumenta com elevações na temperatura (COSTA, 2000). A redução na fase de platô do potencial de ação, devido ao maior influxo de  $\text{K}^+$ , como já foi discutido anteriormente, também poderia explicar esse fato. A Manutenção do THR a 35° C poderia, ainda, ser resultante da combinação desses fatores.

No presente trabalho, as elevações no TPT, em ambas as temperaturas, indicam que o músculo permanece mais tempo ativo devido a maior disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$ , o que se reflete no desenvolvimento de força. O prolongamento do TPT, a 35° C, e sua maior responsividade sugere modificações na cinética dos canais iônicos, aumentando a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  disponível no citosol. Essa maior concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  disponível no citosol poderia ser proveniente tanto do meio extracelular, que estaria adentrando a sarcolema via canais L ou NCX, quanto da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques do RS. Presumivelmente, ocorreu uma combinação destes fatores.

As assertivas acima sugerem que o curimatá beneficia-se de incrementos do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para o processo de E-C, concordando com a maioria dos resultados encontrados por outros autores, entretanto não é descartada a hipótese da participação do RS como fornecedor de cálcio ao aparato contrátil, em ambas as temperaturas testadas.

#### **4.2.3. Efeito da adição de adrenalina sobre a força de contração e parâmetros tempo-dependentes a 25° C e 35° C.**

Os peixes apresentam respostas clássicas ao estresse frente a variações agudas ou crônicas no ambiente em que vivem. Esses animais respondem a mudanças nos ambientes interno ou externo por meio da liberação de catecolaminas (CA) (FABBRI et al., 1998). A magnitude da elevação nos níveis das catecolaminas plasmáticas pode variar de acordo com o tipo do estresse imposto, com a severidade do estresse e também com a espécie (REID et al., 1998).

Nos peixes, as CA são liberadas na circulação pelo tecido cromafim. Segundo SCHEUERMANN (1993), podem ser definidas como células cromafins quaisquer células derivadas da neuroectoderme, inervadas por fibras pré-ganglionares simpáticas e capazes de sintetizar, armazenar e secretar catecolaminas. Nos mamíferos, estas células estão localizadas, principalmente, na medula adrenal. Entretanto, por não possuírem glândulas adrenais verdadeiras, o tecido cromafim dos peixes pode estar localizado em diferentes regiões.

O sistema cromafim de teleósteos consiste em células dispersas da região cefálica a caudal, especialmente, nas paredes das grandes veias cardinais posteriores.

A liberação de CA é controlada, principalmente, pelo neurotransmissor acetilcolina das fibras pré-ganglionares, que promove excitação desses hormônios na corrente sanguínea. Entretanto, há consideráveis evidências de que um grande número de neurotransmissores não colinérgicos e de hormônios podem estar envolvidos na modulação da liberação de adrenalina e noradrenalina nos vertebrados.

Dentre os agentes humorais estariam a serotonina, a angiotensina, peptídeos natriuréticos, cortisol, peptídeos opióides, adenosina, histamina e as próprias catecolaminas. Os fatores não humorais incluiriam o íon potássio, o oxigênio e a acidose (REID et al., 1998), sendo que os dois últimos são considerados agentes estressores para os peixes.

A redução dos níveis de oxigênio no sangue é um dos principais fatores que iniciam a liberação de CA pelo tecido cromafim de teleósteos (REID et al., 1998). No entanto, estudos têm demonstrado a presença de concentrações tônicas de adrenalina circulantes nos peixes sob condições de repouso ( $10^{-9}$  M) (MILLIGAN et al., 1989).

Frente a diferentes mecanismos estressores, tais como: hipóxia, acidose metabólica, hipotensão, hipoglicemia, alterações agudas na temperatura e exercício

físico, a liberação aumentada de CA (adrenalina e/ou noradrenalina) pode ser considerada uma resposta compensatória para otimizar a função cardiovascular e respiratória e mobilizar reservas energéticas devido ao aumento metabólico associado com o estresse (FABBRI, et al., 1998). Entretanto, PERRY & BERNIER (1999) sugerem que a liberação de adrenalina só ocorre em situações de estresse severo como, por exemplo, numa situação de hipóxia, em que a liberação de CA ocorre abruptamente quando a saturação da hemoglobina atinge 50%.

McDONALD & MILLIGAN (1992) enfatizam que, em situações de estresse severo, as concentrações de adrenalina circulantes podem chegar a  $10^{-6}$  M.

Em teleósteos, a adrenalina é a principal catecolamina que influencia o sistema cardiovascular e pode causar efeitos tanto inotrópicos, quanto cronotrópicos (FARREL & JONES, 1992).

Os efeitos inotrópicos positivos causados pela adrenalina, geralmente, estão relacionados com a presença de receptores  $\beta_2$  no coração desses animais. A ligação da adrenalina a tais receptores promove ativação da enzima adenilato ciclase (via proteína G), aumentando a concentração de AMPc, que ativa uma proteína quinase A (PKA). A PKA, por sua vez, fosforila os canais do tipo L e os receptores de rianodina, aumentando a condutância desses canais que culmina na maior disponibilidade de  $Ca^{2+}$  ao aparato contrátil e maior desenvolvimento de força (MACLENNEAN & KRANIAS, 2003; BOLLER & POTT, 1989).

Além de aumentar a concentração de  $Ca^{2+}$  no citosol, alguns estudos utilizando miocárdio de mamíferos têm mostrado que a adrenalina aumenta também a tomada de  $Ca^{2+}$  pelo RS (Tada et al., 1974 *apud* COSTA et al., 2004). Um esquema do efeito das catecolaminas no tecido cardíaco é mostrado na figura 21.

Os resultados do presente estudo evidenciaram que a adição de doses crescentes de adrenalina não teve nenhum efeito significativo sobre o desenvolvimento de força a 25° C (controle). No entanto, a força desenvolvida a 25° C foi sempre superior àquela observada a 35° C.

Nos experimentos conduzidos a 35° C, a adrenalina promoveu inotropismo positivo nas maiores concentrações testadas, sendo que esse efeito igualou o desenvolvimento de força dessas preparações à força apresentada pelo controle (25° C). Esses resultados evidenciam que, quando sujeitos a uma condição estressante, tal como a elevação aguda da temperatura (que provoca redução no desenvolvimento de força), o

curimatá pode lançar mão das catecolaminas liberadas pelo tecido cromafim para adaptar-se ao estresse momentâneo.

Resultados semelhantes foram encontrados por COSTA et al. (2000) em tilápia do Nilo, em que a adição de doses crescentes de adrenalina promoveu inotropismo positivo nos experimentos conduzidos em temperaturas elevadas (40° C), porém, não teve efeito na temperatura de aclimação (25° C).

Entretanto, alguns estudos relataram que, em temperaturas elevadas, os miócitos cardíacos demonstram menos sensibilidade à ação da adrenalina. Um exemplo dessa menor sensibilidade em maiores temperaturas foi observado em truta marrom, que apresentou aumentos no débito cardíaco com adição de adrenalina tanto a 14° C (15%) quanto a 18° C (30%). No entanto, a 18° C foram necessárias doses maiores de adrenalina (1µM) em relação àquelas utilizadas a 14° C (MERCIER, et al., 2002).

COSTA (2003), trabalhando com a pirambóia, observou fato semelhante, em que nas temperaturas mais baixas (15 e 25° C) a adrenalina promoveu inotropismo positivo, enquanto a 35 °C esse efeito foi abolido. A autora sugere que, nas temperaturas mais elevadas, os transportadores de membrana já estariam transportando a maior quantidade possível de  $Ca^{2+}$  nas condições controle (2,5 mM de  $Ca^{2+}$ ), tornando, assim, impossível que qualquer agente inotrópico, tal como a adrenalina, melhorar a contração muscular.

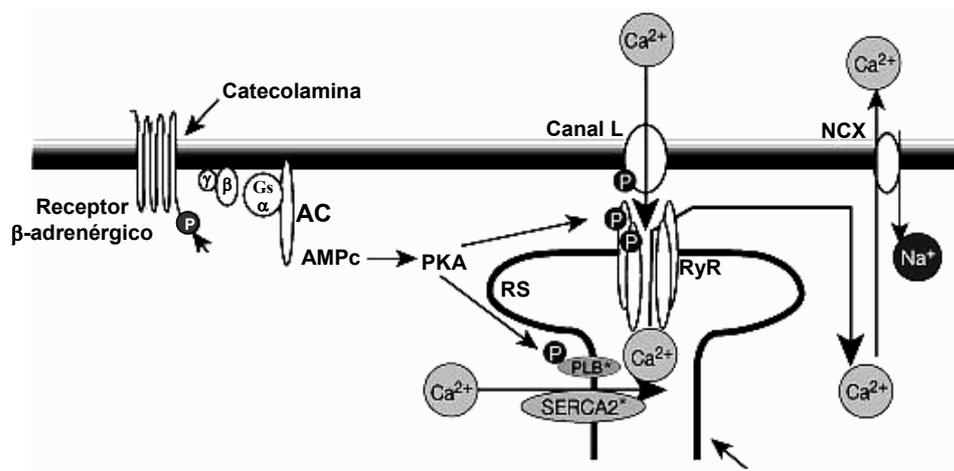


FIGURA 21. Esquema demonstrando o efeito da adrenalina sobre os mecanismos transportadores de  $Ca^{2+}$  no miócito cardíaco. AC – adenilato ciclase; NCX – trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ ; PKA – proteína-quinase A; PLB - fosfolambano; RS – retículo sarcoplasmático; RyR – receptor de rianodina; SERCA<sub>2</sub> –  $Ca^{2+}$ -ATPase do retículo endo-sarco-plasmático.

CHEN et al. (2002) demonstraram que uma redução na temperatura de 25° C para 12° C promoveu aumento nas concentrações de adrenalina plasmática de ~ 50 para ~ 60 ng/mL e noradrenalina de ~ 25 para ~ 45 ng/mL, mas, após algumas horas, os níveis tendem a diminuir. Esses dados sugerem que uma das respostas do estresse causado pela diminuição aguda da temperatura é a elevação nas concentrações das CA plasmáticas. Entretanto, embora existam vários trabalhos (já citados) avaliando os efeitos dos incrementos nas concentrações de adrenalina *in vitro*, são escassos os trabalhos que mensuram os níveis plasmáticos desses hormônios provenientes do tecido cromafim frente a elevações da temperatura *in vivo*.

O inotropismo positivo poderia ainda estar relacionado ao o aumento da velocidade das reações que promovem o influxo e o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  no miócito ou, possivelmente, uma combinação de tais fatores. Essa hipótese pode ser reforçada por meio do protocolo de incrementos da  $[\text{Ca}^{2+}]$  extracelular, já que os anéis ventriculares de curimatá responderam de maneira semelhante a 25° C e 35° C aos incrementos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio, ou seja, mesmo a 35° C, o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular promoveu inotropismo positivo.

O cronotropismo positivo causado pela adrenalina em temperaturas mais elevadas sugere que uma estimulação  $\beta$ -adrenérgica temperatura-dependente poderia ser um meio para diminuir a relação força-freqüência negativa em elevadas temperaturas (como o observado no presente estudo e discutido no item 4.2.5.) e manter o débito cardíaco adequado. Isto sugere que a espécie é adaptada a elevações agudas na temperatura.

Já foi constatado que, em mamíferos, a adrenalina estimula a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  da sarcolema, o que impede o acúmulo de  $\text{Na}^+$  dentro da célula, favorecendo, assim, o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através do NCX (BERS, 1991).

Como mencionado anteriormente, a função do RS também é modificada pela adrenalina via fosforilação do fosfolambano.

O fosfolambano é uma pequena proteína transmembrana que exerce efeito inibitório sobre a atividade da SERCA, impedindo o seqüestro de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS. A fosforilação do fosfolambano libera a SERCA da inibição causando aumento na velocidade do seqüestro de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS e, como consequência, há o relaxamento do miocárdio. O aumento na tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS promove um maior acúmulo deste íon neste reservatório e sua maior liberação nos batimentos subseqüentes, o que se traduz num aumento na contratilidade (MUNDIÑA-WEILENMANN, et al., 2001).

Normalmente a fosforilação do fosfolambano é controlada por um mecanismo de retroalimentação, em que a redução na concentração cálcio dentro do RS ativa proteínas-quinase que desencadeiam o processo de fosforilação (BHOGAL & COLYER, 1998). A estimulação  $\beta$ -adrenérgica pelas catecolaminas também possui capacidade de ativar uma proteína-quinase A que, por sua vez, fosforila o fosfolambano desinibindo a SERCA e aumentando a tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS, diminuindo os parâmetros tempo-dependentes. (VASSALO et al., 1994; SHIELS & FARREL, 1997). Entretanto, a fosforilação dos miofilamentos protéicos também poderia contribuir para um relaxamento mais rápido por aumentar a taxa de dissociação do  $\text{Ca}^{2+}$  com a troponina C, este efeito também é desencadeado pela adrenalina (Robertson et al. *apud* LAYLAND & KENTISH, 2002).

No presente estudo, os parâmetros tempo-dependentes foram sempre superiores a 25° C que a 35° C, como já comentado anteriormente, esse é um efeito da própria elevação da temperatura sobre a cinética dos canais. A adrenalina não causou modificações nesses parâmetros em ambas as temperaturas testadas.

Nos estudos realizados por KEEN, et al. (1993) com truta arco-íris, os parâmetros cardiovasculares, tais como a frequência cardíaca, volume de ejeção e débito cardíaco mostraram-se mais sensíveis (cerca de 10 vezes) à ação da adrenalina em animais aclimatados a 8° C que naqueles aclimatados a 18° C. Os autores sugerem que a aclimatação a menores temperaturas aumenta a densidade de receptores  $\beta$ -adrenérgicos na sarcolema, neste caso observou-se um aumento de 3 vezes. Uma estimulação adrenérgica aumentaria o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais L da sarcolema sendo manifestado pelo aumento no desenvolvimento de força. Esse mecanismo seria responsável pelas respostas nas variáveis comentadas acima.

Além de influenciar o número de receptores, a aclimatação térmica também influenciaria o tipo de receptor presente, pois, de acordo com MILLIGAN (1991), os miócitos de truta arco-íris são mais sensíveis à noradrenalina que à adrenalina quando aclimatados a 20° C, se comparados com aqueles aclimatados a 9° C. No presente trabalho, apenas as variações agudas na temperatura foram estudadas, não sendo possível inferir sobre os efeitos crônicos da mesma.

O fato de diversos estudos terem demonstrado a existência de uma relação inversa entre a temperatura e o número de adrenoceptores levou alguns pesquisadores a supor que espécies provenientes de climas tropicais possuíssem menor número de adrenoceptores, quando comparados com espécies de clima temperado ou da Antártica.

Entretanto, uma comparação feita entre sete espécies provenientes dos três climas citados demonstrou claramente que isso não acontece e, ao invés de uma relação negativa, existe uma relação positiva entre o número de adrenoceptores e entre a elevação da temperatura. Isso demonstra que a regulação dos adrenoceptores, em resposta, à temperatura, pode diferir entre a temperatura de aclimação e da adaptação evolucionária. Intraespecificamente, o frio pode sinalizar a “*up-regulation*” dos adrenoceptores, mas, interespecificamente, temperaturas mais quentes podem estar associadas a altos níveis de adrenoceptores (OLSSON et al., 2000).

De acordo com FABBRI et al. (1998), a adrenalina é a principal catecolamina que afeta a contratilidade em muitos teleósteos, e causa tanto efeitos cronotrópicos, quanto inotrópicos positivos. Os efeitos cronotrópicos positivos estão, geralmente, correlacionados à ocupação de receptores do tipo  $\beta_2$  no coração (ASK et al., 1983) e a aumentos no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , através da sarcolema via canais L (KEEN et al., 1992). Efeitos cronotrópicos negativos também têm sido descritos em alguns peixes, mas não há um consenso sobre os mecanismos envolvidos nesse efeito. Na enguia européia, as catecolaminas reduzem a frequência contrátil induzindo a liberação de acetilcolina (CAMERON & BROWN, 1981), enquanto que, este mesmo efeito, na perca, provavelmente, é mediado pela ativação de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (TIRRI & RIPATTI, 1982). A coexistência de receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos, responsáveis por efeitos negativos e positivos, respectivamente, foi demonstrada em coração de carpas (TEMMA et al., 1989).

Efeitos inotrópicos positivos de catecolaminas atuando via  $\alpha$ -adrenoceptores cardíacos em enguias (*Anguilla japonica*) foram descritos por CHAN & CHOW (1976). Em truta, a ocupação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos tem sido associada ao aumento de AMPc e à fosforilação dos canais L pela PKA, fazendo com que os mesmos permaneçam um maior tempo aberto e, conseqüentemente, levando a um maior influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (TIBBITS et al., 1992).

Dessa forma, fica evidente a falta de homogeneidade nos resultados descritos pela literatura e, também, a grande variabilidade interespecífica nas respostas às catecolaminas circulantes.

#### **4.2.4. Tensão pós-reposo**

Apesar de a maioria dos estudos indicarem que a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  cálcio-induzida (LCCI), típica de mamíferos é menos importante na ativação do acoplamento

excitação-contração em peixes (GESSER, 1996; COSTA et al., 2002), fez-se necessária a investigação da presença de um RS funcional na espécie em questão, pois, trata-se de um peixe tropical muito ativo, diferente da maioria das espécies tropicais já estudadas (ex: traíra, cascudo e muçum).

Evidências recentes indicam que a contribuição do RS como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  ao aparato contrátil é variável e, em alguns casos, pode tornar-se a principal fonte de cálcio ativador no miócito cardíaco de peixes (VORNANEN et al., 2002).

A caracterização da potenciação pós-pausa pode fornecer informações úteis sobre os mecanismos básicos de controle da contração do músculo cardíaco tais como: o grau de participação dos estoques intracelulares como fornecedores do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador durante a contração, e a atividade do NCX (VASSALO & MILL, 1998).

Existem proeminentes diferenças espécies-específicas no processo de acoplamento excitação-contração e no relativo papel das fontes intra e extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  entre peixes teleósteos. Em algumas espécies de peixes, o RS de miócitos ventriculares e/ou atriais sob certas circunstâncias pode representar a maior fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  sistólico. Estas diferenças interespecíficas são obviamente uma estratégia evolucionária para a adaptação a diferentes habitats e a diferentes modos de vida. Existem também diferenças interespecíficas na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  cálcio-induzida, dependendo das mudanças crônicas ou agudas da temperatura (TIITU, 2002).

Durante a pausa, o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser bombeado para fora da célula pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  transarcolemal ou pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) ou, ainda, ser estocado em compartimentos intracelulares como o RS. Acredita-se que, quando os anéis ventriculares são submetidos a uma pausa diastólica prolongada, o RS armazene  $\text{Ca}^{2+}$  suficiente para potencializar a primeira contração pós-pausa (figura 3), sendo esta potenciação continuada geralmente nas próximas 15 contrações. Apesar de não fisiológico e temperatura-dependente, esse fenômeno tem sido uma ferramenta útil para a verificação de um RS funcional.

Em preparações ventriculares de mamíferos, tais como coelhos e porquinhos da índia, períodos de repouso são seguidos por pequenas e progressivas reduções na força que são acompanhadas por um paralelo decaimento nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  na RS. Por outro lado, no ventrículo de ratos e cães, períodos de pausa causam aumentos na força de contração. Nos anéis ventriculares de ratos, em particular, a potenciação da força pós-pausa é acompanhada por manutenção ou elevação nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , no interior do RS.

No presente estudo, a pausa prolongada de 5 min promoveu um significativo aumento na força de contração isométrica de curimatá, tanto a 25° C quanto a 35° C. O efeito foi mais pronunciado a 25° C, já que nesta temperatura o aumento na força de contração isométrica foi de aproximadamente, 60%, enquanto a potenciação observada a 35° C foi de, aproximadamente, 28% em relação aos valores obtidos antes da pausa. Entretanto, esses valores não diferiram significativamente entre si. O decréscimo pós-pausa da força de contração em temperaturas elevadas é um indicativo de que, durante o repouso, os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares estariam sendo reduzidos. Esta redução se dá provavelmente devido à alta atividade do NCX, promovendo a extrusão do íon da célula, uma vez que este parece ser o principal mecanismo de efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  da célula em mamíferos e peixes (TIBBITS et al., 1992; BERS, et al., 1993).

Dados semelhantes aos encontrados neste estudo foram relatados por COSTA et al. (2004) que desenvolveu estudos de tensão pós-pausa com pirambóia em três diferentes temperaturas (15, 25 e 35° C) e observou que elevações na temperatura eram acompanhadas por decréscimos na potenciação pós-pausa o que, segundo a autora, comprova uma elevada dependência do NCX em relação à temperatura. Isso sugere que em animais adaptados a temperaturas relativamente mais altas, um aumento temperatura-dependente da atividade do NCX poderia vir a ser uma forma muito eficaz de melhorar tanto a contração, quanto o relaxamento cardíaco (COSTA, 2003).

No presente estudo, a adição de 10  $\mu\text{M}$  de rianodina aboliu totalmente a potenciação pós-pausa tanto nas preparações controle (25° C), quanto a 35° C. Esses resultados demonstram que, neste animal, o RS contribui como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  em temperaturas fisiológicas. Outros teleósteos tropicais que apresentaram padrões de respostas semelhantes aos encontrado para curimatá foram a traíra, *H. malabaricus* (OLLE, 2003), o muçum, *S. marmoratus* (ROCHA, 2004), e o pacu, *P. mesopotamicus* (ANELLI-JR et al., 2004). Entretanto, estudos da função cardíaca de peixes neotropicais ainda são escassos.

Por outro lado, nossos resultados contrariam a hipótese proposta por SHIELS & FARRELL (1997) de que elevações na temperatura aumentam a atividade do SR e, conseqüentemente, seu grau de participação como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  ao aparato contrátil. Em seus experimentos desenvolvidos com trutas a 12° C e 22° C, eles observaram que, na temperatura mais elevada, os animais apresentavam uma maior dependência do cálcio liberado pelo RS para o desenvolvimento de força.

A hipótese de que a elevação aguda na temperatura aumente o grau de participação do RS no acoplamento excitação-contração também não se aplica ao amorê (RANTIN, et al., 1998) e a tilápia-do-nilo (COSTA et al., 2000), uma vez que ambas as espécies estão sujeitas a variações diárias da temperatura ambiental e demonstraram ser totalmente insensível à rianodina tanto na temperatura de aclimação (25° C) quanto quando a temperatura foi elevada para 35° C ou 40° C.

Estudos recentes realizados com o “burbot” *Lota lota*, uma espécie encontrada em rios de pouca correnteza e adaptada a águas geladas, quando testadas nas temperaturas de 1° C e 2° C (TIITU & VORNANEN, 2001), revelaram que a adição de rianodina aboliu totalmente a tensão de repouso desenvolvida pelo animal. Resultados semelhantes a estes também foram relatados em truta por HOVE-MADSEN, (1992) e AHO & VORNANEN (1998).

No entanto, na maioria dos estudos realizados com peixes de ambientes temperados, o RS se mostrou insensível à rianodina. Dentre estes, pode-se citar a carpa cruciana, um peixe euritérmico (que tolera variações de temperatura de 0 a 36° C) demonstrou ser insensível à rianodina tanto a 4° C quanto a 23° C (TIITU & VORNANEN, 2003).

Estudos morfológicos realizados por CHUGUN et al. (1999) mostraram que apesar do RS de carpa ter um importante papel no fornecimento de  $Ca^{2+}$  ativador ao aparato contrátil a 25° C, este é extremamente esparsa e de tamanho reduzido e apresenta um número menor de “sítios” de ligação com a rianodina quando comparado com o RS de rato, o que reforça a teoria de que o  $Ca^{2+}$  liberado pelo RS desempenha um papel menos vital nos teleósteos quando comparados com os mamíferos. O menor número de sítios de ligação com a rianodina poderia indicar a necessidade de maior concentração de  $Ca^{2+}$  para ativar a liberação de  $Ca^{2+}$  pelo RS em peixes.

O aspecto que levou os pesquisadores a acreditarem que o  $Ca^{2+}$  extracelular provavelmente suporte o acoplamento excitação-contração em peixes teleósteos, bem como em demais vertebrados inferiores, está justamente relacionado à morfologia e à estrutura de seus miócitos cardíacos. Células cardíacas de rãs e peixes apresentam tamanho reduzido, sendo que a maioria dos teleósteos apresenta miócitos com diâmetro entre 2,5 e 6,0  $\mu m$ , variando desde 1,0 a 12,5  $\mu m$ . Já nos mamíferos, tais diâmetros estão entre 10 e 25  $\mu m$ . Além do tamanho reduzido, os miócitos cardíacos dos teleósteos são longos e estreitos em comparação com as células de mamíferos. Miócitos ventriculares de truta arco-íris, por exemplo, apresentam 180  $\mu m$  de comprimento e 8

µm de diâmetro com uma área de superfície sarcolemal de 3000-4000 µm<sup>2</sup> (VORNANEN et al., 2002). Portanto, os teleósteos possuem uma área de superfície sarcolemal por unidade volume de célula 4 a 5 vezes maior que a dos mamíferos (VORNANEN, 1999). Além disso, as miofibrilas estão arranjadas periféricamente, o que facilita muito as trocas entre os espaços intra e extracelulares nos peixes (DRIEDZIC & GESSER, 1994). No entanto, a literatura é pobre em dados sobre a ultraestrutura dos miócitos de peixes teleósteos.

De acordo com TIITU & VORNANEN (2003), as diferenças espécie-específicas e temperatura-induzidas na sensibilidade à rianodina no coração de peixes são dependentes de uma estreita relação entre os receptores de dihidropiridina (DHPR), canais do tipo L e os receptores de rianodina (RyR) e da razão RyR/DHPR. Esses autores encontraram um número significativo de RyR em todas as espécies testadas (rato, carpa, “burbot” e truta), mesmo naquelas que não se mostravam sensíveis a rianodina. No entanto, a densidade desses canais foi claramente menor em peixes que em ratos. A razão RyR/DHPR também foi menor em peixes quando comparada com ratos e grandemente correlacionada com o grau de sensibilidade à rianodina. Truta arco-íris, a espécie menos sensível à rianodina, apresentou o dobro de receptores DHPR em comparação à carpa, ao “burbot” e ao rato. Em truta, a temperatura de aclimação não teve efeito sobre a RyR/DHPR. Já carpas aclimatadas em menores temperaturas (4° C) essa razão foi menor, quando comparadas àquelas aclimatadas a águas mais quentes (17° C). Entretanto, o influxo de Ca<sup>2+</sup> em ambos os grupos, foi similar. A densidade dos receptores de rianodina mensurada nas três espécies de teleósteos ficou entre 37% (carpa aclimatada ao frio) e 74% (truta aclimatada ao frio) daquela observada para ratos, sendo que o “burbot” apresentou um número intermediário de RyR entre a carpa e a truta, o que indica a presença de um número substancial desses receptores no coração de teleósteos, esses valores são de 3 a 5 vezes superiores a outros encontrados em estudos prévios. No entanto a aclimação a baixas temperaturas não modificou o número desses receptores, nas espécies de peixes estudadas, sugerindo que as mudanças temperatura-induzidas na função cardíaca das mesmas não estão associadas com mudanças no número de canais de rianodina, e ainda que a baixa RyR/DHPR no coração de peixes em comparação ao coração de ratos indica que a liberação de cálcio cálcio-induzida, típica de mamíferos é menos importante para a ativação da contratilidade em miócitos ventriculares de peixes.

BERS (1987, 1989) enfatiza que, em mamíferos, o canal de rianodina do RS apresenta elevada dependência em relação à temperatura, operando mais eficazmente em temperaturas mais elevadas. Assim, a elevação aguda da temperatura poderia evidenciar indiretamente um possível aumento da contribuição desta organela na geração de força do tecido cardíaco que apresenta um RS funcional.

Em truta, em temperatura ambiente apesar da existência de um potente NCX, o RS contribui com cerca de 50% do total de cálcio transiente (Hove-Madsen et al., 1999 *apud* HOVE-MADSEN et al., 2001).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam a presença de um RS funcional no miocárdio ventricular de curimatá em ambas as temperaturas testadas, especialmente, na temperatura de aclimatação, podendo, potencialmente, contribuir com o manejo do  $\text{Ca}^{2+}$  no processo acoplamento excitação-contração no músculo cardíaco desta espécie, reduzido as distâncias difusionais nas temperaturas próximas daquelas onde este animal pode ser encontrado em seu habitat.

Dessa maneira, pode-se sugerir que o  $\text{Ca}^{2+}$ , responsável pela ativação das miofibrilas, causando a contração muscular nos miócitos de curimatá deve originar-se de duas fontes: o meio extracelular e o RS. Entretanto, é importante saber se tal funcionalidade ocorre em frequências de contração cardíaca fisiológicas. Para avaliar-se a funcionalidade do RS em diferentes frequências de contração cardíaca, faz-se necessário o estudo da relação força-frequência.

Alguns autores sugerem haver uma correlação entre o nível de atividade da espécie e a presença de um RS funcional nos miócitos cardíacos. Assim, espécies de natação rápida, como atuns e cavalas demonstraram sensibilidade à rianodina (SHIELS et al., 1999; SHIELS & FARRELL, 2000). Os resultados do presente estudo estão de acordo com esta hipótese, já que o curimatá é uma espécie migratória e muito ativa.

#### **4.2.5. Efeito do aumento na frequência de estimulação.**

O estudo da relação entre a frequência de estimulação e a força isométrica desenvolvida (relação força-frequência) é de fundamental importância para a compreensão da habilidade do coração em desenvolver força perante diferentes frequências de estimulação (SHIELS et al., 2002). Isto se deve ao fato de que o aumento no metabolismo requer concomitante aumento no débito cardíaco, que é o produto da frequência cardíaca e do volume de ejeção.

Como visto no item 4.1, a elevação na temperatura da água afetou significativamente a frequência cardíaca do curimatá, promovendo elevação da mesma. Entretanto, alguns autores sugerem que o mecanismo de Frank-Starling é mais importante para aumentar o débito cardíaco em peixes que nos mamíferos (SHIELS et al., 2002), o que torna imprescindível o desenvolvimento de estudos que mensurem a força sob diferentes frequências de estimulação.

Sabe-se que existem diferenças na relação força-frequência entre diversos grupos de vertebrados. Segundo RIVAROLI (2002), estas diferenças parecem refletir, indiretamente, variações nos processos de acumulação e liberação do cálcio, inclusive a participação efetiva do RS como fornecedor e armazenador deste íon durante o ciclo cardíaco.

Nos mamíferos, que apresentam RS funcional, a força é tipicamente aumentada com elevações na frequência de estimulação, mecanismo conhecido como relação força-frequência positiva ou efeito escada positivo (SHIELS et al., 2002).

LAYLAND & KENTISH (1999), desenvolveram um estudo com trabéculas ventriculares de ratos nas temperaturas de 24, 30 e 37° C e com frequências de estimulação variando entre 0,1 a 12 Hz. Os níveis de  $Ca^{2+}$  sistólico e diastólico também foram monitorados (fluorescência). Estes pesquisadores observaram uma relação força-frequência positiva em todas as temperaturas testadas, com declínio a partir de 3 Hz a 24° C, 6 Hz a 30° C e 10 Hz a 37° C. Os pesquisadores atribuíram a queda no desenvolvimento de força a um relaxamento incompleto, já que os níveis diastólicos de  $Ca^{2+}$  apresentaram-se aumentados e concluíram que a relação força-frequência positiva observada é devida a uma liberação frequência-dependente do  $Ca^{2+}$  do RS. Estes autores sugeriram que sob altas frequências ou sobrecarga  $Ca^{2+}$ , esse sistema poderia estar saturado, o que diminuiria a liberação de  $Ca^{2+}$  pelo RS, e conseqüentemente o desenvolvimento de força.

A relação força-frequência tem sido documentada para diversas espécies de teleósteos, especialmente, aquelas de clima temperado. Para a maioria das espécies estudadas, o desenvolvimento da força de contração diminui com o aumento na frequência de estimulação. Esta relação inversa é denominada relação força-frequência negativa ou efeito escada negativo (DRIEDZIC & GESSER, 1985; MERCIER et al., 2002). Assim, em frequências elevadas a força é reduzida de 50 a 90% no músculo cardíaco da maioria dos teleósteos, antes que as mesmas se tornem arrítmicas (SHIELS et al., 2002).

Os resultados do presente estudo demonstraram que, a 25° C, a elevação na frequência de estimulação promoveu redução na força isométrica desenvolvida pelos anéis ventriculares, ou seja, relação força-frequência negativa. Os experimentos desenvolvidos na temperatura mais elevada (35° C), apresentaram comportamento semelhante ao controle. No entanto, a força de contração inicial foi menor, corroborando as assertivas discorridas acima.

A adição de rianodina tanto nas preparações controle quanto a 35° C causou drástica redução no desenvolvimento de força, tanto em baixas frequências (~ 87%–controle e ~ 67% - 35° C), quanto em frequências fisiológicas (~ 67% – controle e ~ 57% - 35° C).

Os resultados observados neste experimento são condizentes com àqueles obtidos nos estudos de tensão pós-pausa, em que se observou maior potenciação da força em temperaturas fisiológicas (25° C). Assim, pode-se sugerir uma contribuição efetiva do RS para o acoplamento excitação-contração tanto em temperaturas, quanto em frequências fisiológicas.

Em frequências subfisiológicas, a rianodina causou maior depressão na força a 35° C quando comparada com o controle. SHIELS & FARRELL, (1997) sugerem que a capacidade de truta arco-íris em manter uma  $F_c$  máxima durante elevações na temperatura e na frequência de estimulação pode estar relacionada ao recrutamento dos estoques de  $Ca^{2+}$  do RS.

Mudanças no desenvolvimento de força estão diretamente relacionadas a mudanças no transiente de cálcio intracelular. Portanto, reduções nos níveis de cálcio citoplasmático levariam a reduções na força de contração devido a menor disponibilidade de  $Ca^{2+}$  para ativar os filamentos contráteis (SHIELS et al., 1999). Essas reduções nos níveis citoplasmáticos de cálcio sob altas frequências podem estar relacionadas a uma diminuição do influxo deste íon via sarcolema, através dos canais L ou NCX, à redução na liberação de cálcio do RS ou ainda a uma combinação dos dois mecanismos (liberação de cálcio cálcio-induzida).

Em tiras ventriculares de trutas, o declínio no desenvolvimento de força em função de aumentos na frequência de estimulação foi maior a 18 °C que a 14 °C, sendo que tais diferenças foram evidenciadas a partir de 1,2 Hz. Porém, neste trabalho foram utilizadas doses tônicas de adrenalina (1nM) (MERCIER et al., 2002).

Segundo LAYLAND & KENTISH (1999), a taxa na qual o RS pode acumular cálcio começa a ser limitada pelo aumento na frequência de estimulação, uma vez que o intervalo entre os batimentos cardíacos é cada vez menor. Ao redor desse ponto, os mecanismos que tendem a reduzir a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (por exemplo, o tempo reduzido para que os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS se recuperem de seu estado adaptado/inativo) predominariam, causando um declínio na força de contração.

Em miócitos ventriculares de truta, incrementos na frequência de estimulação de 0,2 para 1,4 Hz, causaram aumentos significativos na concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (diastólico) e diminuição na duração do potencial de ação. Por outro lado, durante a sístole, houve queda na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente, que levou à diminuição da amplitude de contração (diminuição da força). Os autores verificaram que o RS contribui com ~15% do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente e que houve uma diminuição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  frequência-dependente através dos canais L, mas que a tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS não foi afetada pelos aumentos na frequência de estimulação (HARWOOD et al., 2000).

Essa relação força-frequência negativa também foi documentada para algumas espécies tropicais, tais como o amorê de poça de maré (RANTIN et al., 1998), tilápia-do-nilo (COSTA et al., 2000), traíra (OLLE, 2003), pacu (ANELLI-JR et al., 2004) e a pirambóia, (COSTA et al., 2004). Entretanto, estudos desenvolvidos com tiras ventriculares de répteis, anfíbios e elasmobrânquios e tiras atrias de atum demonstraram uma relação força-frequência positiva em baixas frequências de estimulação, mas que se tornava negativa à medida que a frequência era elevada (DRIEDZIC & GESSER, 1985,1988; KEEN et al., 1992).

SHIELS et al. (1999) observaram que em miócitos atrias de atum de nadadeira amarela, a adição de rianodina ao meio reduz o desenvolvimento de força independentemente da temperatura (15, 18 ou 25° C) ou da frequência testada. Em 25 °C, a utilização do RS foi mais ou menos constante em frequências fisiológicas, mas aumentou significativamente em altas frequências, sugerindo maior participação do ciclo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS nessas condições. Em baixas frequências, a utilização do RS foi mais acentuada a 18° C e 25° C quando comparado com 15° C. No entanto, em frequências fisiológicas a porcentagem de utilização do RS foi maior em temperaturas mais baixa.

Dessa maneira, os resultados obtidos no presente trabalho vêm contrariar a maioria dos estudos, os quais afirmam que mesmo em espécies com RS relativamente bem desenvolvido como a truta, este apresenta papel importante como fornecedor de

$\text{Ca}^{2+}$  ao aparato contrátil somente em temperaturas supra-fisiológicas e/ou frequências sub-fisiológicas (KEEN et al., 1994; HOVE-MADSEN, 1992; SHIELS et al., 2002).

SHIELS & FARRELL (1997), estudando trutas aclimatadas a 12° C e 22° C e testadas em ambas as temperaturas evidenciaram que a 22° C, a adição de rianodina diminuiu o pico de tensão em todas as frequências. A magnitude da contribuição do  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do RS foi inversamente relacionada com a frequência de estimulação, porém permanece significativa em temperaturas fisiológicas. Em contraste, quando os estudos foram realizados em baixas temperaturas (12° C), a rianodina reduziu o pico de tensão somente em baixas frequências de estimulação. Esses resultados sugerem que o papel do RS como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador para o desenvolvimento de tensão, apesar de secundário, é significativo em temperaturas elevadas (supra-fisiológicas). Já em temperaturas e frequências fisiológicas, o RS parece não ser relevante no suprimento de  $\text{Ca}^{2+}$  para os elementos contráteis dessa espécie.

A frequência de contração máxima atingida está intimamente relacionada ao grau de desenvolvimento do RS e à eficiência dos mecanismos transportadores sarcolemais, sendo que as maiores frequências são observadas em fibras musculares que apresentam um RS mais desenvolvido e/ou mecanismos de transporte sarcolemais muito eficientes (HELLE, 1983).

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que a frequência de contração máxima suportada pelo miocárdio ventricular de curimatá é maior a 35° C, resultado este corroborado por outros estudos realizados com várias espécies de peixes neotropicais, tais como os estudos desenvolvidos por RANTIN et al. (1998) com o amborê, COSTA et al. (2000) com a tilápia-do-nylo, ANELLI-JR et al. (2004) com o pacu, COSTA et al. (2004) com a pirambóia e ROCHA (2004) com o muçum. Esse padrão de resposta também foi documentado para espécies de ambientes temperados por SHIELS et al. (2002) para a truta arco-íris e a carpa e por SHIELS & FARRELL (2000) para a cavala do Pacífico. Esses resultados vêm confirmar a hipótese da presença de um NCX depende da temperatura, tornando-se mais ativo em temperaturas elevadas, causando assim a extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio extracelular mais rapidamente, permitindo que o músculo suporte maiores frequências de estimulação. Como já discutido anteriormente, tanto a presença de um RS funcional, quando de mecanismos transsarcolemais eficientes para a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  permitem que o músculo suporte maiores frequências de estimulação (COSTA, 2003).

Poder-se-ia considerar que se somente a diminuição do influxo do cálcio, via sarcolema, pudesse ser responsável pela redução da força em altas frequências, a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio levaria à manutenção da força ou ainda ao desenvolvimento de relação força-frequência positiva. No entanto, a elevação nas concentrações de cálcio de 2 para 9 mM somente reduziu a relação força-frequência negativa mas não a aboliu (DRIEDZIC & GESSER, 1985, 1988).

Portanto, o desenvolvimento de força sob elevadas frequências de estimulação poderia estar sendo influenciado tanto pelos mecanismos que promovem a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, quanto por aqueles que promovem sua extrusão, o que levaria a um relaxamento incompleto e, conseqüentemente, à diminuição da força.

A restituição mecânica descreve a habilidade do músculo cardíaco em produzir força em diferentes (geralmente curtos) intervalos diastólicos, sendo estes determinados pelos mecanismos moleculares envolvidos no processo acoplamento excitação-contracção do miócito cardíaco. O processo molecular responsável por iniciar o batimento cardíaco necessita de um tempo finito para se recuperar da inativação do batimento precedente para dar início a uma nova contracção de igual magnitude (TIITU, 2002).

Um mecanismo de restituição incompleta é denominado tensão de repouso (RT) e pode ser evidenciado em altas frequências de estimulação, causando a diminuição da força desenvolvida (TIITU, 2002).

Segundo SHIELS & FARRELL (1997), em peixes, o relaxamento é um passo crucial para a manutenção da força de contracção mediante a elevação da frequência, o que pode ser evidenciado pelo aumento do RT. Portanto, o RT resulta da elevação nas concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  livre e aumentos no RT evidenciam uma maior dificuldade em reduzir os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  como aqueles observados em repouso. Condições de elevado influxo deste íon através da sarcolema, devido à alta frequência dos potenciais de ação, fazem com que o  $\text{Ca}^{2+}$  permaneça disponível ao aparato contrátil mesmo após o desenvolvimento da tensão.

No presente estudo, foi possível evidenciar o relaxamento incompleto em todas as preparações. Nas preparações controle (sem rianodina) em ambas as temperaturas (25° C ou 35° C) testadas foi observado o aumento na tensão de repouso a partir de 1,2Hz. Enquanto que nas preparações com adição de rianodina, o RT tornou-se significativo a partir de frequências mais elevadas de 1,6 Hz, a 25° C e 1,4 Hz a 35° C. Não foram observadas diferenças significativas entre os protocolos experimentais.

Segundo LAYLAND & KENTISH (1999), sob altas frequências de estimulação o aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  distólico (responsável pelo desenvolvimento do RT) ocorre, presumivelmente, porque o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  excede a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  que pode ser removido pelo RS ou pelos mecanismos de extrusão durante a redução dos intervalos de estimulação.

O fato de ter-se observado maiores valores de RT nas preparações com adição de rianodina sugere que, quando o RS perde sua função como acumulador de  $\text{Ca}^{2+}$ , a concentração deste íon no citosol aumenta, provavelmente, porque somente os mecanismos transportadores  $\text{Ca}^{2+}$  transsarcolemais não são suficientes para promover a extrusão do íon. A 35° C, os valores de RT foram significativamente maiores que os observados a 25° C, corroborando a afirmação de que, em temperaturas elevadas, os mecanismos de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  estão mais ativos, levando a um maior acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma.

Assim, os resultados obtidos demonstram que o curimatá é uma espécie tropical bem adaptada as mudanças térmicas impostas pelo ambiente, sugerindo mecanismos eficientes tanto para a influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (RyR, canais L e NCX), durante a contração do miócito, quanto para sua extrusão do sarcoplasma (SERCA e NCX) durante o relaxamento.

Cabe salientar que o curimatá é uma espécie bastante ativa, o que justificaria a presença de um RS funcional para manter a taxa adequada de força sob altas frequências de contração, como as impostas durante o exercício intenso. Além disso, a presença de um RS funcional também poderia ser uma adaptação a elevadas temperaturas tais como as observadas em algumas regiões do Brasil onde esta espécie pode ser encontrada.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a respeito dos efeitos de mudanças agudas na temperatura, as possíveis fontes de cálcio ativador do processo de acoplamento excitação-contração e o efeito da adrenalina sobre o miocárdio ventricular do teleósteo neotropical curimatá, permitiram as seguintes conclusões:

- a. Ajustes cronotrópicos são o principal mecanismo utilizado pela espécie para manter seu débito cardíaco frente a incrementos na temperatura, uma vez que a elevação na temperatura promoveu incrementos na  $f_H$  enquanto a força de contração isométrica reduziu-se;
- b. A redução de TPT e THR com a elevação da temperatura é um indicativo de que os mecanismos transportadores de  $Ca^{2+}$  são temperatura-dependentes, aumentando sua atividade e contribuindo para o cronotropismo positivo observado na espécie;
- c. A recuperação dos valores de  $f_H$  após o retorno à temperatura de aclimação reforça a adaptação da espécie às variações ambientais;
- d. O efeito inotrópico positivo da adição de doses crescentes de adrenalina a 35° C sugere que em situações de estresse severo, tais como aqueles enfrentados quando a temperatura do meio é modificada, a liberação endógena deste agonista contribui para a manutenção do débito cardíaco tanto por aumentar a frequência cardíaca, quanto por promover incrementos na força de contração;
- e. Os resultados indicam que, em curimatá, os íons cálcio responsáveis pela ativação dos miofilamentos do músculo cardíaco são provenientes de duas fontes: o RS e o meio extracelular;
- f. A redução na força de contração à medida que a frequência de estimulação foi aumentada (relação força-frequência negativa), tanto a 25 quanto a 35° C, sugere mecanismos ineficientes tanto de fornecimento quanto de retirada de íons cálcio do sarcoplasma em elevadas frequências de contração;

- g. Os aumentos da tensão de repouso (RT), tanto a 25 quanto a 35° C, indicam o relaxamento incompleto em elevadas frequências e reforçam a ineficiência da extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  sob tais condições;
- h. A queda drástica no desenvolvimento de força em todas as frequências testadas após a adição de rianodina demonstra a presença de um RS funcional nesta espécie, mesmo em frequências fisiológicas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L.H.; KALININ, A. L. & RANTIN, F.T. The effects of temperature on oxygen uptake, gill ventilation and ECG waveforms in serrasalmid fish, *Piaractus mesopotamicus*. *J. Therm. Biol.*, v. 27, pp. 299-308, 2002.

AHO, E. & VORNANEN, M.  $Ca^{2+}$  - ATPase activity and  $Ca^{2+}$  uptake by sarcoplasmic reticulum in fish heart: effects of thermal acclimatation. *J. Exp. Biol.*, v. 201, pp. 252-232, 1998.

AHO, E. & VORNANEN, M. Contractile properties of atrial and ventricular myocardium of the heart of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effects of thermal acclimatation. *J. Exp. Biol.*, v. 202, pp. 2663-2677, 1999.

ANELLI-JR, L.C. *Função cardíaca do teleósteo tropical Piaractus mesopotamicus, submetido a diferentes condições térmicas* São Carlos, SP, 2002, 64 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós - Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.

ANELLI-JR, L.C.; OLLE, C.D.; COSTA, M.J.; RANTIN, F.T.& KALININ, A.L. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from the neotropical teleost *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887 – Teleostei, Serrasalminidae). *J. Therm. Biol.*, v. 29, pp. 103-113, 2004.

ASK, J.A. comparative aspects of adrenergic receptors in the hearts of lower vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 76A, n. 3, pp. 543-552, 1983.

BAARTSCHEER, A.; SCHUMACHER, C. A.; OPTHOF T. & FIOLET. J. W. T. The Origin of Increased Cytoplasmic Calcium upon Reversal of the  $Na^{+}/Ca^{2+}$ -Exchanger in Isolated Rat Ventricular Myocytes. *J. of Mol. and Cel. Card.* (1996) v. 28, pp. 1963–1973, 1996.

BAILEY, J.R. & DRIEDZIC, W.R. Enhanced maximum frequency and force development of fish hearts following temperature acclimatation. *J. Exp. Biol.*, v. 149, pp. 239-254, 1990.

BAUDET, S. & NOIREAUD, J. Pharmacologic avaluation of isometric contraction-relaxation coupling indexes in rabbit ventricular muscle. *J. Pharmacol. Toxicol.* v. 42, pp. 12-30, 1999.

- BAYLEY, P.B. Studies on the migratory characin *Prochilodus platensis* Holmberg, 1889. *J. of Fish Biol.*, v. 5, pp. 25-40, 1973.
- BERS, M.D. Ryanodine and the calcium content of cardiac RS assessed by caffeine and rapid cooling contractures. *Am. J. Physiol.*, v. 253, pp. C408-C415, 1987.
- BERS, M.D. RS  $\text{Ca}^{2+}$  loading in cardiac muscle preparations based on rapid cooling contractures. *Am. J. Physiol.*, v. 256, C109-C120, 1989.
- BERS, D.M.  $\text{Ca}^{2+}$  regulation in cardiac muscle. *Méd. Sci. Sports Exerc.*, v.23, pp.1157-1162, 1991.
- BERS, D.M. Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. *Circ Res.*, v. 87, pp. 275-281, 2000.
- BERS, D.M. Insight review articles: Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, v. 415, pp. 198-204, 2002.
- BERS, M.D.; BASSANI, W.M. & BASSANI, R.A. Competition and redistribution among calcium transporthing systems in rabbit cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* v. 27, pp.1772-1777, 1993.
- BHOGAL, M.S. & COLYER, J. Depletion of  $\text{Ca}^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle prompts phosphorylation to stimulate store refilling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 95 n.4, pp. 1484-1489, 1998.
- BLANK, J.M.; MORRISSETTE, J.M.; DAVIE, P.S. & BLOCK, B.A. Effects of temperature, epinephrine and  $\text{Ca}^{(2+)}$  on the hearts of yellowfin tuna (*Thunnus albacaris*). *J. Exp. Biol.*, v. 205, pp. 1881-1888, 2002.
- BLATTER, L.A.; HÜSER, J. & RÍOS, E. Sarcoplasmic reticulun  $\text{Ca}^{2+}$  release flux underlying  $\text{Ca}^{2+}$  sparks in cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 94, n. 8, pp. 4176-4181, 1997.
- BOLIS, C. L.; PICCOLELLA, M.; DALLA VALLE, A.Z & RANKIN, C.J. Fish as model pharmacological and biological research. *Pharmac. Res.*, v. 44, n. 4, pp. 264-280, 2001.

BOLLER, M. & POTT, L.  $\beta$ -adrenergic modulation of transient inward current in guinea-pig cardiac myocytes. *Pflugers Arch. (Eur. J. Physiol.)*, v. 415, pp. 276-288, 1989.

BONETTO, A.A. & PIGNALBERI, C. Nuevos aportes al conocimiento de las migraciones de los peces en los ríos mesopotámicos de la República Argentina. *Comm. Inst. Nac. Limnol.*, Santo Tomé, v. 1, pp.1-14, 1964.

BOWEN, S.H. Detritivory in Neotropical fish communities. *Env. Biol. of Fishes*, v.9, pp. 137-144, 1983.

BRITO, S.G.; SIROL, R.N.; VIANNA, N.C.; JARDIM, M.S.; SANTOS, J.C. & PESILARI, E. *Peixes do Rio Paranapanema*. São Paulo: Horizonte Geográfico, 2003.

CASTRO, R.M.C. *Prochilodus britskii*, a new species of prochilodontid fish (Ostariophysi: Characiformes), from the rio Apiaca, rio Tapajos system, Mato Grosso, Brazil. *Proc. of The Biol. Soc. of Washington*, v. 106, pp. 57-62, 1993.

CAMERON, J.S. & BROWN, S.E. Adrenergic and clinergic responses of the isolated heart of the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. and Physiol.*, v. 70C, pp. 109-115, 1981.

CHAN, D.K. & CHOW, P.H. The effects of acetylcholine, biogenic amines and other vasoactive agents on the cardiovascular functions of the Eel, *Anguilla japonica*. *J Exp Zool.*, v. 196, n.1, pp. 13-26, 1976.

CHEN, W.H.; SUN, L.T.; TSAI, C.L.; SONG, Y.L. & CHANG, C.F. Cold stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulinM, and leucocyte phagocytosis in tilapia. *Gen. and Comp. Endoc.*, v. 126, pp.90-100, 2002.

CHUGUN, A. ; OYAMADA, T.; TEMMA, K.; HARA, Y. & KONDO, H. Intracellular  $Ca^{2+}$  storage sites in the carp heart: comparison with the rat heart *Comp. Biochem. and Physiol.* (A), v. 123, pp. 62-267, 1999.

COOKE, S.J.; GRANT, E.C.; SCHREER, J.F., PHILIPP, D.P. & DEVRIES, A.L. Low temperature cardiac response to exhaustive exercise in fish with different levels of winter quiescence *Comp. Biochem. and Physiol.*, (A) v. 134, pp. 157-165, 2003.

CORONADO, R.; MORRISSETTE, J.; SUKHEREVA, M. & VALGHAN, D.M. Estruture and function of rianodine receptores. *Am. J. Physiol.*, v. 246, n. 35, pp. 1994.

COSTA, M.J. Função cardíaca *in vivo* e *in vitro* da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, submetidas a alterações agudas de temperatura. São Carlos, SP, 1998, 122. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós - Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.

COSTA, M.J. Efeito da temperatura sobre a contratilidade cardíaca e controle intracelular do cálcio no miocárdio ventricular de *Lepidosiren paradoxa*. São Carlos, SP 174p. 2003. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.

COSTA, M.J.; RIVAROLI, L.; RANTIN, F.T. & KALININ, A.L. Cardiac tissue function of the teleost fish *Oreochromis niloticus* under different thermal conditions. *J. Therm. Biol.*, v.25, pp.373-379, 2000.

COSTA, J.M.; OLLE, C.D.; RATTO, J.A.; ANELLI-JR, L.C.; KALININ, A.L. & RANTIN, F.T. Effect of acute temperature transition on chronotropic and inotropic responses in the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa*. *J. Therm. Biol.*, v. 27, pp. 39-45, 2002.

COSTA, M.J.; OLLE, C.D.; KALININ, A.L. & RANTIN, F.T. Role of the sarcoplasmic reticulum in calcium dynamics of the ventricular myocardium of *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi) at different temperatures. *J. Therm. Biol.*, v. 29, pp. 81-89, 2004.

COYNE, M.D.; KIM, C.S.; CAMERON, J.S. & GWATHMEY, J. K. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from rainbow trout. *J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* v. 278, pp. 1-19, 2000.

DRIEDZIC, W.R. & GESSER, H.  $Ca^{2+}$  protection from the negative inotropic effect of contraction frequency on teleost hearts. *J. Comp. Physiol.(B)*, v. 156, pp. 135-142, 1985.

DRIEDZIC, W.R. & GESSER, H. Differences in force-frequency relationships and calcium dependency between elamobranch and teleost hearts. *J. Exp. Biol.*, v. 140. pp. 227-241, 1988.

DRIEDZIC, W.R. & GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. *Physiol. Rev.* v. 74, pp. 221-258, 1994.

ELIAS, C.L.; XUE, X.H.; MARSHALL, C.R.; OMELCHENKO, A.; HRYSHKI, L.V. & TIBBTIS, G.F. Temperature dependence of cloned mammalian and salminid cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger isoforms. *Am. J. Physiol.*, v. 281, pp. C993-C1000, 2001.

ESPINACHROS, R.A.; SVERLIJ, S.; MESTRE, J.P.; FABIANO, G. & AMESTOY, F. Desplazamientos migratorios de peces marcados en el tramo inferior del río Uruguay. *In: Segundo Seminario "El Rio Uruguay. Sus Recursos Pesqueros";* (Comision Administradora del Río Uruguay), Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina, 1990.

ESTEVEZ, F.A. *Fundamentos de Limnología*. 2º ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 602p.  
FABBRI, E.; CAPUZZO, A. & MOON, T.W. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 120 C, pp. 177-192, 1998.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* v. 245C, pp. 1-4, 1983.

FARREL, A.P. & JONES, D.R. The heart. *In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrel, A.P. (Eds.), Fish Physiology, Vol.12 (A). The Cardiovascular System, Academic Press, New York, pp. 1-88, 1992.*

FARRELL, A.P.; GAMPERL, A.K.; HICKIS, J.M.T.; SHEILS, H.A. & JAIN, K.E. Maximum cardiac performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at temperatures approaching their upper lethal limit *J. Exp. Biol.*, v. 119, pp. 663-672, 1996.

FARRELL, A.P. Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: insights into cardiovascular design limitations in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. (A)*, v. 132, n. 4, pp. 797-810, 2002.

FARRELL, E.F.; ANTARAMIAN, N.; RUEDA, A. & GÓMES, A.M. Sorcin inhibits calcium release and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 36, pp. 34660-34666, 2003.

FAY, R.R. & POPPER, A.N. Evolution of hearing in vertebrates: the inner ears and processing. *Hearing Research*, v. 149, pp. 1-10, 2000.

FLECKER, A.S. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. *Ecology*, v. 77, pp.1845-1854, 1996.

FRITSCHÉ, R. Hypoxia in Fish: *Cardiovascular and respiratory adjustments and the control of catecholamine release*. PhD thesis. University of Göteborg, Sweden, 61p. 1993.

GAMPERL, A.K. & FARRELL A.P. Commentary Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *The J. of Exp. Biol.*, v. 207, pp. 2539-2550, 2004.

GEHRKE, P.C. & FILDER, D.R., Effects of temperature acclimation and dissolved oxygen on heart, ventilation rate and oxygen consumption of spangled perch. *Leipotherapon unicolor*. *J. Comp. Physiol.*, v. 157 (B), pp. 771-782, 1998.

GESSER, H. The effects of hypoxia and reoxygenation on force development in myocardium of rainbow trout: protective effects of  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ . *J. Exp. Biol.*, v. 69, pp. 199-206, 1977.

GESSER, H. Cardiac force-interval relationship, adrenaline and sarcoplasmic reticulum in rainbow trout. *J. Comp. Physiol.(B)*, v.166, pp. 278-285, 1996.

GODOY, M.P. Dez anos de observações sobre periodicidade migratória de peixes do rio Mogi-Guaçu. *Rev. Bras. de Biologia*, v. 27, pp. 1-12, 1967.

GUYTON, A.C. & HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, ed. 10<sup>a</sup>, 2002.

HAPER, A.A.; NEWTON, I.P. & WATT, P.W. The effect of temperature on spontaneous action potential discharge on the isolated sinus venosus from winter and summer plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Exp. Biol.*, v.180, pp. 137-140, 1995.

HARWOOD, C.L.; HOWARTH, F.C.; ALTRINGHAM, J.D. & WHITE E. Rate-dependence changes in cell shortening, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels and membrane potential in single, isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ventricular myocytes. *The J. of Exp. Biol.*, v. 203, pp. 493-504, 2000.

HELLE K.B. Structures of functional interest in the myocardium of lower vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 76 (A), n. 3, pp. 447-452, 1983.

HILGEMANN, D.W.; ROOS, K.P. & BRADY, A.J. Slowly relaxing caffeine responses en ratventricule: relationships of ryanodine and caffeine actions. *Am. J. Physiol.*, v. 256, n. 25, pp. H1100-H1109, 1989.

HILGEMANN, D.W.; MATSUOKA, S.; NAGEL, G.A. & COLLINS, A. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange: sodium-dependent inactivation. *J. Gen Physiol* v.100, pp. 905–932, 1992.

HOVE-MADSEN, L. The influence of temperature on ryanodine sensitivity and force-frequency relationship in the myocardium of rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, v. 167, pp. 47-60, 1992.

HOVE-MADSEM, L.; LLACH, A. & TORT, L. The function of the sarcoplasmic reticulum is not inhibited by low temperatures in trout atrial myocytes. *Am. J. Physiol.*, v. 281, pp. R1902-R1906, 2001.

JONES, L.R.; BESCH-JR, H.R.; SUTKO, J.L. & WILLERSON, J.T. Ryanodine-induced stimulation of net  $\text{Ca}^{++}$  uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 209, pp. 48-55, 1979.

KAMP, T.J. & HELL, J.W. Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Circ Res.* v. 8, pp. 1095-1102, 2000.

KATZ, A.M. Molecular biology of calcium channels in the cardiovascular system. *The Am. J. of Car.*, v. 80, n. 9 (A) pp. 180-221, 1997.

KEEN, J.E.; FARRELL, A.P.; TIBBITS, G.F. & BRILL, R.W. Cardiac physiology in tunas II. Effect of ryanodine, calcium, and adrenaline on force-frequency relationship in atrial strips from skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Can. J. Zool.*, v. 70, pp. 1211-1217, 1992.

KEEN, J.E.; VIANZON, D.M.; FARRELL, A.P. & TIBBITS, G.F. Thermal acclimatation alters both sensitivity and adrenoceptor density in cardiac tissue of rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, v. 181, pp. 1211-1217, 1993.

KEEN, J.E.; VIANZON, D.M.; FARRELL, A.P. & TIBBITS, G.F. Effect of temperature and temperature acclimatation on ryanodine sensitivity of trout myocardium. *J. Comp. Physiol.*, v. 164, pp. 438-443, 1994.

- KIMURA, J.; MIYAMAE, S. & NOMA, A. Identification of sodiumcalcium exchange current in single ventricular cells of guineapig. *J. Physiol (Lond)* v. 384, pp.199–222, 1987.
- LADEIRA-FERNANDEZ, A.M.; MORRISSETE, J.M.; BLANK, J.M. & BLOCK, B.A. Temperature dependence of the Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA2) in the ventricles of tuna and mackerel. *Am. J. Physiol.*, v. 286, pp. R398-R404, 2004.
- LAYLAND, J. & KENTISH, J.C. Positive force and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am. J. Physiol.*, pp. 9-118, 1999.
- LENNARD, R. & HUDDART, H. The efect of thermal stress on electrical and mechanical responses and associated calcium movements of ounder heart and gut. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 98A, pp. 221-228, 1990.
- MACLENNEAN, D.H. & KRANIAS, E.G. Phospholanban: A crucial regulator of cardiac contractility. *Nature*, v.4, pp. 566-577, 2003.
- MAHONY, L. Regulation of intracellular calcium concentration in the developing heart. *Card. Res.*, v. 31, pp. E61-E67, 1996.
- MARICONDI-MASSARI, M.; KALININ, A.L.; GLASS, M.L. & RANTIN, F.T. The effects of temperature on oxygen uptake, gill ventilation and ECG waveforms in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. therm. Biol.* v. 23, n. 5, pp. 283-290, 1998.
- MARKS, A. R. Cardiac intracellular calcium release channels. *Circ. Res.*, v. 87, n. 8, pp. 1-11, 2003.
- MARTONOSI, A.N. & PIKULA, S. The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim. Polonica*, v. 50, n. 1, pp. 1-30, 2003.
- MATTHEWS, K.R. & BERG, N.H. Raibow trout responses to water temperature and dissolved oxygen stress in two southern California strem pools. *J. Fish Biol.* v. 50, pp. 50-67, 1997.
- McDONALD, D.M. & MILLIGAN, C.L. Chemical and physical properties of the blood. *In*: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P. (Eds.), *Fish Physiology: The cardiovascular System*, v. 12 (A). Academic Press, New York, pp. 55-113, 1992.

MERCIER, C.; CLAIREAUX, G. & IMBERT, N. Effects of temperature on sarcoplasmic reticulum activity and regulation of ventricular cardiomyocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 126 (B), pp. S1-S108, 2002.

MEISSNER, G.; RIOS, E.; TRIPATHY, A. & PASEK, D.A. Regulation of skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) by  $\text{Ca}^{2+}$  and monovalent cations and anions. *J. Biol. Chem.*, v. 272, pp. 1628-1638, 1997.

MILLIGAN, C.L. Adrenergic stimulation of substrate utilization by cardiac myocytes isolated from rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, v. 35, pp. 229-236, 1991.

MILLIGAN, C.L.; GRAHAM, M.S. & FARRELL, A.P. The response of trout red cells to adrenaline during seasonal acclimation and changes in temperature. *J. Fish. Biol.* v. 35, pp. 229-236, 1989.

MOYES, C.D. Cardiac metabolism in high performance fish. *Comp. Biochem. Physiol.* v.113 (A), n. 1, pp. 69-75, 1996.

MUNDIÑA-WEILENMANN, C.; VITTONI, L.; MATILDE, S. & MATTIAZZI, A. Phospholamban: una pequeña proteína que regula la contractilidad miocárdica *Rev Fed Arg Cardiol* v. 30, pp. 651-658, 2001.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C. & PAVANELLI, C.S. *Ovos e larvas de Peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação*. 1ª ed., Maringá: ADUEM, 2001. 378p.

NAYLER, W.G.; DAILE, P.; CHIPPERFIELD, D. & GAN, K. Effect of rryanodine on calcium and cardiac muscle. *Am. J. Fisiol.*, v. 219, n. 6, pp. 1620-1626, 1970.

OLLE, C.D. Função cardíaca do teleósteo *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) submetido a diferentes condições térmicas. São Carlos, SP, 2003, 94. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós - Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.

OLSSON, H.H.; YEE, N. & SHIELS, H.A. A comparasion of myocardial B-adrenoceptor density and ligand binding affinity among selected teleost fishes. *J. Comp. Physiol* (B), v. 170, pp. 545-550, 2000.

PELSTER, B. Environmental influences on the development of the cardiac system in fish and amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A), v. 124, pp. 407-412, 1999.

PELSTER, B.; BURGGREN, W.W.; PETROU, S. & WAHLQVIST, I. Developmental changes in the acetylcholine influence on heart muscle of *Rana catesbiana*: in situ and in vitro effects. *J. Exp. Zool.*, v. 267, pp. 1-8, 1993.

PERRY, S.F. & BERNIER, N.J. The acute humoral adrenergic stress response in fish: facts and fiction. *Aquaculture*, v. 177, pp. 285-295, 1999.

RANDALL, D.J. Functional morphology of the heart and fishes. *Am. Zool.*, v. 8, pp. 179-189, 1968.

RANTIN, F.T.; GLASS, M.L.; KALININ, A.L. & VERSOLA, R.M.N. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hopliais marabaricus* and *Hopliais lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. *Env. Biol. Fish.*, v. 36, pp. 93-97, 1993.

RANTIN, F.T.; GESSER, H.; KALININ, A.L.; GUERRA, C.D.R.; FREITAS, J.C. & DRIEDZIC, W. R. Heart performance,  $Ca^{2+}$  regulation and energy metabolism at high temperatures in *Bathygobis soporator*, a tropical, marine teleost. *J. Therm. Biol.*, v. 23, pp. 31-39, 1998.

REID, S.D.; MCDONALD, D.G. & WOOD, C.M. Interactive effects of temperature and pollutant stress. In: Wood, C.M., McDonald, D.G. (Eds.) *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine fish*. Cambridge University Press. London. pp. 325-349, 1997.

REID, S.G.; BERNIER, N.J. & PERRY, S.F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiology (C)*, v. 120, n. 1, pp. 1-27, 1998.

RIVAROLI, L., Respostas cronotrópicas e inotrópicas do miocárdio ventricular de três espécies de peixes tropicais ecologicamente distintas: curimatá, *Prochilodus lineatus*, traíra, *Hopliais malabaricus*, e cascudo *Hypostomus regani* São Carlos, SP, 2002, 72 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.

ROCHA, M.L. Manejo do cálcio intracelular e influência da temperatura sobre a contratilidade cardíaca de *Synbranchus marmoratus*. São Carlos, SP, 2004, 102 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós - Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade federal de São Carlos, SP, Brasil.

ROUSSEAU, E.; SMITH, J.S. & MEISSNER, G. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *Am. J. Physiol.*, v. 253, n. 22, pp. C364-368, 1987.

SATOH, N.; SATO, T.; SHIMADA, M.; YAMADA, K. & KITADA, Y. Lusitropic effect of MCC-135 is associated with improvement of sarcoplasmic reticulum function in ventricular muscles of rats with diabetic cardiomyopathy. *The J. of Pharmacol. and E. Ther.*, v. 298, n. 3, pp. 1161-1166, 2001.

SCHEUERMANN, D.W. Comparative morphology, cytochemistry and innervation of chromaffin tissue in vertebrates. *J. Anat.*, v. 183, pp. 327-342, 1993.

SHATTOCK, M.J. & BERS, D.M. The inotropic response to hypothermia and the temperature dependence of ryanodine action in isolated rabbit and rat ventricular muscle: Implications for E-C coupling. *Circ. Res.* v. 61, pp. 761-771, 1987.

SHI, H. & JACKSON, D.C. Effects of anoxia, acidosis and temperature on the contractile properties of turtle cardiac muscle strips. *The J. of Exp. Biol.*, v. 200, pp.1965-1973, 1997.

SHIELS, H.A. & FARRELL, P. The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing  $\text{Ca}^{2+}$  to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, v. 200, pp. 1607-16221, 1997.

SHIELS, H. A.; FREUND, E.V.; FARRELL, A.P. & BLOCK, B.A. The sarcoplasmic reticulum plays a major role in isometric contraction in atrial muscle of yellowfin tuna. *J. Exp. Biol.* v. 202, pp. 881-890, 1999.

SHIELS, H.A. & FARRELL, P. The effect of ryanodine on isometric tension development in isolated ventricular trabeculae from Pacific mackerel (*Scomber japonicus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 125 (A), pp. 331-341, 2000.

SHIELS, H.A.; VORNANEN, M. & FARRELL, A. Temperature-dependence of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current in atrial myocytes from rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, v.203, pp. 2771-2780, 2000.

SHIELS, H.A.; VORNANEN, M. & FARRELL, P. The force-frequency relationship in fish heart – a review. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.132 (A), pp. 811-826, 2002.

STERN, M.D. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys. J.*, v. 62, pp. 497-517, 1992.

TAYLOR, E.W. & IHMIED, Y.M. Vagal and adrenergic tone on the heart of *xenopus laevis* at different temperatures. *J. Therm. Biol.*, v. 20, n. 1/2, pp. 55-59, 1995.

TEMMA, K.; KOMAZU, Y.; SHIRAKI, Y.; KITAZAWA, T. & KONDO H. The roles of alpha- and beta-adrenoceptors in the chronotropic responses to norepinephrine in carp heart (*Cyprinus carpio*). *Comp Biochem Physiol (C)*, v. 92, n.1, pp. 149-53, 1989.

THOMAS, M.J.; HAMMAN, B. & TIBBITS, G.F. Dihydropyridine and ryanodine binding in ventricles from rat, dogfish and hagfish. *The J. of Exp. Biol.* v. 199, pp. 1999–2009, 1996.

TIBBITS, G.F.; PHILIPSON, K.D. & KASHIHARA, H.A. Characterization of myocardial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, v. 262, n. 31, pp. C411-C417, 1992.

TIBBITS, G.F.; XU, L. & SEDARAT, F. Ontogeny of excitation-contraction coupling in the mammalian heart. *Comp. Biochem. Physiol. (A)*, v. 132, pp. 691-698, 2002.

TIITU, V. Temperature as a modifier of fish cardiac contractility. 2002. 110p. PhD Thesis. University of Joensuu, 2002.

TIITU, V. & VORNANEN, M. Cold adaptation suppresses the contractility of both atrial and ventricular muscle of the crucian carp heart. *J. Fish Biol.*, v. 59, pp. 141-156, 2001.

TIITU, V. & VORNANEN, M. Ryanodine and dihydropyridine receptor binding in ventricular cardiac muscle of fish with different temperature preferences. *J. Comp. Physiol. (B)*, v. 173, pp. 285-291, 2003.

TIRRI, R. & RIPATTI, P. Inhibitory adrenergic control of heart rate of perch (*Perca fluviatilis*) *in vitro*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 73A, n. 2, pp. 399-401, 1982.

VASSALO, D.V.; LIMA, E.Q.; CAMPAGNARO, P.; STEFANON, LEITE, M.C. & MILL, J.G. Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. *Pharmacol. Res.*, v. 29, pp. 251-260, 1994.

VASSALO, D.V. & MILL, J.G. Mechanical behaviour of rest contractions in cardiac muscle. *Acta Physiol. et Pharmacol. Latiniam.*, v. 38, pp. 87-97, 1998.

VERANI, Análise quantitativa aplicada em experimentos de cultivo intensivo do curimatá – *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1981 (Characiformes- Prochilodontidae). São Carlos, SP, 149 p. 2003. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil. 1987.

VORNANEN, M., Regulation of contractility of the fish (*Carassius carassius* L.) heart ventricle. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 94, pp. 455-483, 1989.

VORNANEN, M. L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current and fish cardiac myocytes: Effects of thermal acclimation and beta-adrenergic stimulation. *J. Exp. Biol.*, v. 201, pp. 533-547, 1998.

VORNANEN, M.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger current in ventricular myocytes of fish heart: contribution to sarcolemal  $\text{Ca}^{2+}$  influxo. *J. Exp. Biol.*, v. 202, pp. 1763-1775, 1999.

VORNANEN, M.; SHIELS, H.A. & FARRELL, A.P. Plasticity of excitation-contraction coupling in fish cardiac myocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 132, pp. 827-846, 2002.

WELCOMME, R.L. *Fisheries Ecology of Floodplain Rivers*. Longman, Inc., New York, 1979.

XUE, X.H.; HRYSHKO, L.V.; NICOLL, D.A. PHILIPSON, K.D. & TIBBITIS, G.F. Cloning, expression, and characterization of the trout cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Am. J. Physiol.*, v. 277, n. 46, pp. C693-C700, 1999.