

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

Efeitos da acidose láctica nos processos da contratilidade  
cardíaca do teleósteo de água doce matrinxã,  
*Brycon cephalus*.

André Guelli Lopes

São Carlos-SP  
2009

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

Efeitos da acidose láctica nos processos da contratilidade  
cardíaca do teleósteo de água doce matrinxã,  
*Brycon cephalus*

André Guelli Lopes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin  
Agência Financiadora: CNPQ

São Carlos-SP  
2009

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar

L864ea

Lopes, André Guelli.

Efeitos da acidose láctica nos processos da contratilidade cardíaca do teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* / André Guelli Lopes. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

75 f.

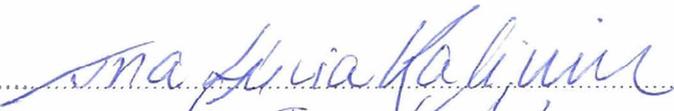
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Coração. 2. Acidose. 3. Tensão isométrica. 4. Retículo sarcoplasmático. 5. Tiras ventriculares. 6. *Brycon cephalus*. I. Título.

CDD: 612.17 (20ª)

Universidade Federal de São Carlos  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Convênio UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de André Guelli Lopes

Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin.....  
Prof. Dr. Cleo Alcantara Costa Leite.....  
Profa. Dra. Monica Jones Costa.....

O homem que pensa  
Tem a fronte imensa  
Tem a fronte pensa  
Cheia de tormentos  
O homem que pensa  
Traz nos pensamentos  
Os ventos preclaros  
Que vêm das origens.  
O homem que pensa  
Pensamentos claros  
Tem a fronte virgem  
De ressentimentos.  
Sua fronte pensa  
Sua mão escreve  
Sua mão prescreve  
Os tempos futuros.  
Ao homem que pensa  
Pensamentos puros  
O dia lhe é duro  
A noite que lhe é leve:  
Que o homem que pensa  
Só pensa o que deve  
Só deve o que pensa.

*Vinicius de Moraes*

**Para todos que me incentivaram ao pensamento.**

## AGRADECIMENTOS.

À profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin pela valorosa orientação. Obrigado por ter permitido que eu pudesse desenvolver meus estudos junto ao Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Compatativa.

À amiga Ana Kalinin pela disponibilidade, pela ajuda valorosa nos momentos difíceis, pelo constante bom humor e pelo tanto que pude aprender contigo.

Ao prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin pelos bons exemplos e bom humor no dia a dia.

À todos os colegas do laboratório, pois sem eles tudo teria sido mais difícil. Especialmente agradeço, pelas boas risadas e aprendizados importantes, a minha amiga Diana Monteiro e a amiga Juliana Thomaz, e os *brothers* Luciano Rivaroli, Rafael Vô, Nathan, Samuca, Tiaguinho.

Ao corpo docente e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela amizade e pela ajuda no dia a dia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos pela valorosa oportunidade.

Aos professores do CCBS-UFSCar pela minha formação em Biologia.

Ao CNPQ pelo financiamento da pesquisa.

Aos amigos que nunca me faltaram, especialmente: Julio Damalio, Eliseu Frank, Renato Pasquinha, Reinaldo Netão, Danilo Rato, Daniel Zé, ZéLeo, Dimas, Flaviane.

À minha esposa Denise Talarico Guelli Lopes, pelo amor, carinho, amizade, cuidado durante esses cinco anos. Como você é importante para mim.

À minha família: meu pai Djair, minha mãe Lélia, meu irmão Tiago, minha cunhada Vanessa, minha afilhadinha querida Beatriz e ao mais novo integrante Alexandre. Obrigado pelo amor, pelo cuidado e pela paciência. Amo vocês.

Aos meus tios e tias, primos e primas que me renderam muitas boas lembranças.

À minha avó Isaura Vitaliano Guelli, um anjo que confiou em mim, sempre me apoiou, me amou e me mostrou muitos bons exemplos. Obrigado vó, te amo.

Agradeço e dedico este trabalho ao meu avô Elcio de Oliveira Guelli, *in memoriam*, por ter me amado e por nunca ter estado longe de mim, apesar de não estar mais junto aos meus olhos.

## RESUMO

Na maioria das espécies de peixes já estudadas, a força de contração cardíaca é sensível a pequenas mudanças no pH extracelular. Durante natação intensa, o aumento dos níveis de ácido láctico (LA) reduzem significativamente a força de contração (Fc), prejudicando a performance contrátil miocárdica. O teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus*, é uma espécie reofílica que apresenta uma alta capacidade natatória durante migração e alimentação, constituindo um modelo interessante para o estudo de exercício e crescimento. Adicionalmente, uma quantidade considerável do  $\text{Ca}^{2+}$  envolvido na contratilidade nos miócitos cardíacos desta espécie deriva dos estoques intracelulares (retículo sarcoplasmático- RS). O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da acidez láctica extracelular na Fc e no mecanismo do acoplamento excitação-contração. As tiras ventriculares foram montadas para registros de força isométricas durante 40 minutos para avaliar: (a) os efeitos de 22 mM de ácido láctico; (b) os efeitos combinados de 22 mM de ácido láctico e 10 $\mu\text{M}$  de rianodina (um bloqueador específico dos canais de cálcio do RS); (b) os efeitos combinados de 22 mM de ácido láctico e 1mM de amiloride (bloqueador do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  - NHE); (c) os efeitos da substituição do NaCl por LiCl na solução fisiológica (para testar o papel do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  - NCX). A acidose produziu uma curva inotrópica bifásica: uma redução significativa de Fc (~80%) após 5 minutos de exposição e uma recuperação completa da Fc após 20 min. b. Esta redução inicial da Fc parece ser causada por uma redução da sensibilidade miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$ , pois o bloqueio do NCX pelo lítio não alterou esta resposta. A rianodina bloqueou a recuperação de Fc durante a acidose láctica (58.3%), evidenciando o papel do RS no aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e, conseqüentemente, na recuperação de Fc durante a acidez. Adicionalmente, o NHE é igualmente crucial para a recuperação de Fc durante a acidose, pois foi abolida pela amiloride. Tomados conjuntamente, os resultados indicam que o matrinxã é uma espécie ácido-tolerante, apresentando mecanismos eficientes para neutralizar os efeitos inotrópicos negativos da acidose láctica.

## ABSTRACT

In the majority of the fish species already studied, cardiac force contraction is sensitive to small changes in the extracellular pH. During intense swimming, the increased lactic acid (LA) levels significantly reduce the Fc, impairing the myocardial contractile performance. The freshwater teleost matrinxã, *Brycon cephalus*, is a reofilic species presenting a high capacity for swimming against rapids during migration and feeding, constituting an interesting model for studies of exercise and growth. Additionally, a considerable amount of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  in cardiac myocytes of this species derives from intracellular stores (sarcoplasmic reticulum - SR). The goal of this study was to evaluate the effects of the extracellular lactic acidosis on Fc and mechanisms of excitation-contraction coupling. Ventricle strips were mounted for isometric force recordings during 40 minutes to evaluate: (a) the effects of 22 mM of lactic acid; (b) the combined effects of 22 mM of lactic acid and 10  $\mu\text{M}$  of ryanodine (a specific SR calcium channels blocker); (c) the combined effects of 22 mM of lactic acid and 1mM of amiloride (a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger - NHE blocker); (d) the effects of the replacement of NaCl by LiCl in the physiological solution (to test the role of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger - NCX). Acidosis produced a biphasic inotropic curve: a significant Fc reduction (~80%) after 5 min of exposure and a complete Fc recovery after 20 min. This initial Fc reduction seems to be caused by a decreased myofibrillar  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity since the NCX blockade by lithium did not alter this response. Ryanodine blocked the Fc recovery during lactic acidosis (58.3%), evidencing the role of SR in increasing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and, therefore, in the Fc recovery during acidosis. Additionally, the NHE is also crucial for Fc recovery during acidosis since it was abolished by amiloride. Taken together, the results indicate that matrinxã is an acidosis-tolerant species, presenting efficient mechanisms to counteract the negative inotropic effects of lactic acidosis.

## LISTA DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo do coração de um peixe teleósteo.....	2
<b>Figura 2.</b> Ilustração esquemática das principais características que distinguem as 4 categorias de ventrículos em peixes.(extraída de FARRELL & JONES, 1992).....	3
<b>Figura 3.</b> Imagens confocais de miócitos ventriculares de truta e de rato, marcados com di-8-ANEPPS (indicador fluorescente lipofílico) (extraída de SHIELS & WHITE, 2005).....	4
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografia eletrônica de um corte transversal do miócito ventricular de carpa cruciana, <i>Carassius carassius</i> (aumento de 12.000x). As setas apontam para o RS, pobremente desenvolvido. Notar o pequeno diâmetro dos miócitos ( $5,78 \pm 0,11 \mu\text{m}$ ), associado à ausência de túbulos-T e à disposição periféricas das miofibrilas (modificado de VORNANEN, 1997).....	6
<b>Figura 5.</b> Esquema geral do mecanismo de acoplamento E-C do músculo cardíaco, comparando o modelo existente em mamíferos (A) com o proposto para teleósteos (B). A figura também ilustra algumas diferenças entre a estrutura dos miócitos de peixes e mamíferos, como variações no diâmetro das células, distribuição e abundância do RS e existência de túbulos-T. As linhas pontilhadas sugerem um possível papel das fontes de cálcio. DHPR: canal de dihidropiridina; SL: sarcolema; RS: retículo sarcoplasmático; NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (modificado de Tibbits et al., 1992a).....	7
<b>Figura 6.</b> Representação de um exemplar de matrinxã, <i>Brycon cephalus</i> .....	17
<b>Figura 7.</b> Set experimental utilizado para a obtenção das respostas inotrópicas e cronotrópicas das tiras ventriculares de matrinxã. <b>A:</b> banho para órgãos com quatro cubetas; <b>B:</b> banho termostaticado; <b>C:</b> cilindro de mistura carbogênica; <b>D:</b> estimuladores elétricos; <b>E:</b> transdutores de força isométrica, acoplados a microestiradores; <b>F:</b> amplificador de força; <b>G:</b> sistema informatizado com placa de aquisição e tratamento dos dados.....	21
<b>Figura 8.</b> 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.....	23
<b>Figura 9.</b> Força de contração isométrica ( $F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl) e após adição de ácido láctico (AL). Médias $\pm$ E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl. ( $P < ,05$ ).....	26
<b>Figura 10.</b> Tempo para que o pico de tensão seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl) e após adição de ácido láctico (AL). Médias $\pm$ EP.....	27
<b>Figura 11.</b> Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl) e após adição de ácido láctico (AL). Médias $\pm$ E.P. a: diferença em relação ao grupo Ctrl. ( $P < 0,05$ ).....	28
<b>Figura 12.</b> Razão entre tempo para o pico de força e força de contração ( $\text{TPT}/F_c - \text{ms} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^2$ ) das tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após substituição do NaCl por LiCl e adição de ácido láctico (Li-AL). Médias	

± E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais. (P < 0,05).....	29
<b>Figura 13.</b> Razão entre tempo para 50% de relaxamento e força de contração (THR/Fc - ms.mN <sup>-1</sup> .mm <sup>2</sup> ) das tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após substituição do NaCl por LiCl e adição de ácido láctico (Li-AL). Médias ± E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo Li. (P < 0,05).....	30
<b>Figura 14.</b> Força de contração isométrica (Fc - mN.mm <sup>-2</sup> ) de tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl) e após substituição de NaCl por LiCl (Li). Médias ± E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl. (P < 0,05).....	31
<b>Figura 15.</b> Tempo para que o pico de tensão seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl) e após substituição do NaCl por LiCl (Li). Médias ± E.P.....	32
<b>Figura 16.</b> Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl) e após substituição do NaCl por LiCl (Li). Médias ± E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl. (P < 0,05).....	33
<b>Figura 17.</b> Força de contração isométrica (Fc - mN.mm <sup>-2</sup> ) de tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após substituição do NaCl por LiCl e adição de ácido láctico (Li-AL). Médias ± E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença significativa em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. (P < 0,05).....	34
<b>Figura 18.</b> Tempo para que o pico de tensão seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após substituição do NaCl por LiCl e adição de ácido láctico (Li-AL). Médias ± E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais. (P < 0,05).....	34
<b>Figura 19.</b> Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após substituição do NaCl por LiCl e adição de ácido láctico (Li-AL). Médias ± E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. (P < 0,05).....	35
<b>Figura 20.</b> Força de contração isométrica (Fc - mN.mm <sup>-2</sup> ) de tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL), após remoção do Ca <sup>2+</sup> extracelular (ØCa) e após remoção do Ca <sup>2+</sup> extracelular e adição de ácido láctico (ØCaAL). Médias ± E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo ØCa. (P < 0,05).....	37
<b>Figura 21.</b> Tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) por tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL), após remoção do cálcio (ØCa) e após remoção do cálcio e adição de ácido láctico (ØCaAL). Médias ± E.P.....	38
<b>Figura 22.</b> Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL), após remoção do cálcio (ØCa) e após remoção do cálcio e adição de ácido láctico (ØCaAL). Médias ± EP.....	39
<b>Figura 23.</b> Força de contração isométrica (Fc - mN.mm <sup>-2</sup> ) de tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após adição de rianodina e	

ácido láctico (Ri-AL). D: Fc registrada após adição de rianodina. Médias $\pm$ E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL.(P < 0,05).....	40
<b>Figura 24.</b> Tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após adição de rianodina e ácido láctico (Ri-AL). D: Fc registrada após adição de rianodina. Médias $\pm$ E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. (P < 0,05).....	42
<b>Figura 25.</b> Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após adição de rianodina e ácido láctico (Ri-AL). D: Fc registrada após adição de rianodina. Médias $\pm$ E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. (P < 0,05).....	43
<b>Figura 26.</b> Força de contração isométrica (Fc - mN.mm <sup>-2</sup> ) de tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após adição de amiloride e ácido láctico (Am-AL). D: Fc registrada após adição de amiloride. Médias $\pm$ E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. (P < 0,05).....	44
<b>Figura 27.</b> Tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após adição de amiloride e ácido láctico (Am-AL). D: Fc registrada após adição de amiloride. Médias $\pm$ E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. (P < 0,05).....	45
<b>Figura 28.</b> Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após adição de amiloride e ácido láctico (Am-AL). D: Fc registrada após adição de amiloride. Médias $\pm$ E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. (P < 0,05).....	45
<b>Figura 29.</b> Diagrama comparativo do efeito dos diferentes tratamentos, combinados ou não ao ácido láctico, na força de contração isométrica das tiras ventriculares de matrizã.....	46
<b>Figura 30.</b> Possíveis sítios de ação do H <sup>+</sup> na célula miocárdica: 1. Eletrofisiologia; 2a. Ca <sup>2+</sup> ligado à sarcolema; 2b. Trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> (NCX); 2c. Trocador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> (NHX); 2d. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase; 3a. Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA); 3b. Canais de Ca <sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático; 4. Ca <sup>2+</sup> intracelular; 5. Proteínas contráteis; 6. Metabolismo celular e função mitocondrial (Modificado de ORCHARD & KENTISH, 1990).....	59

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores médios de força de contração isométrica ( $F_c$  -  $mN \cdot mm^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL -  $n = 10$ ), após substituição do NaCl por LiCl (grupo Li -  $n = 10$ ) e após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (grupo Li-AL -  $n = 10$ ). Médias  $\pm$  E.P. a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo Li. ( $P < 0,05$ )..... 26
- Tabela 2.** Valores médios do tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL -  $n = 10$ ), após substituição do NaCl por LiCl (grupo Li -  $n = 10$ ) e após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (grupo Li-AL -  $n = 10$ ). Médias  $\pm$  E.P..... 27
- Tabela 3.** Valores médios do tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL -  $n = 10$ ), após substituição do NaCl por LiCl (grupo Li -  $n = 10$ ) e após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (grupo Li-AL -  $n = 10$ ). Médias  $\pm$  E.P. a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. ( $P < 0,05$ )..... 28
- Tabela 4.** Valores médios da razão entre tempo para o pico de força e força de contração ( $TPT/F_c$  -  $ms \cdot mN^{-1} \cdot mm^2$ ) das tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL -  $n = 10$ ), após substituição do NaCl por LiCl (grupo Li -  $n = 10$ ) e após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (grupo Li-AL -  $n = 10$ ). Médias  $\pm$  E.P. a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo Li. ( $P < 0,05$ )..... 29
- Tabela 5.** Valores médios da razão entre tempo para 50% de relaxamento e força de contração ( $THR/F_c$  -  $ms \cdot mN^{-1} \cdot mm^2$ ) das tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL -  $n = 10$ ), após substituição do NaCl por LiCl (grupo Li -  $n = 10$ ) e após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (grupo Li-AL -  $n = 10$ ). Médias  $\pm$  E.P. a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo Li. ( $P < 0,05$ )..... 30
- Tabela 6.** Valores médios de força de contração isométrica ( $F_c$  -  $mN \cdot mm^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL -  $n = 10$ ), após remoção do cálcio (grupo  $\emptyset Ca$  -  $n = 10$ ) e após remoção do cálcio e adição de 22 mM de ácido láctico (grupo  $\emptyset CaAL$  -  $n = 10$ ). Médias  $\pm$  E.P. a: diferença significativa em relação ao grupo Ctrl; b: diferença significativa em relação ao grupo AL; c: diferença significativa em relação ao grupo  $\emptyset Ca$ . ( $P < 0,05$ )..... 36
- Tabela 7.** Valores médios do tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL -  $n = 10$ ), após remoção do cálcio (grupo  $\emptyset Ca$  -  $n = 10$ ) e após remoção do cálcio e adição de 22

- mM de ácido láctico (grupo ØCaAL – n = 10). Médias ± E.P.....37
- Tabela 8.** Valores médios do tempo para 50% de relaxamento (THR – ms) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl – n = 10), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL – n = 10), após remoção do cálcio (grupo ØCa – n = 10) e após remoção do cálcio e adição de 22 mM de ácido láctico (grupo ØCaAL – n = 10). Médias ± E.P. a: diferença significativa em relação ao grupo Ctrl; b: diferença significativa em relação ao grupo AL; c: diferença significativa em relação ao grupo ØCa. P < 0,05..... 38
- Tabela 9.** Valores médios de força de contração isométrica (Fc - mN.mm<sup>-2</sup>) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (Ctrl – n = 10), após adição de 22 mM de ácido láctico (AL – n = 10), após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (Li-AL – n = 10), após adição de 1 mM de amiloride e 22 mM de ácido láctico (Am-AL – n = 10) e após adição de 10 µM de rianodina e 22 mM de ácido láctico (Ri-AL – n = 10). Médias ± E.P. **D** corresponde à Fc registrada após adição de amiloride ou rianodina. a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo Li-AL; d: diferença em relação ao grupo Am-AL. (P < 0,05)..... 40
- Tabela 10.** Valores médios do tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl – n = 10), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL – n = 10), após adição de 1 mM de amiloride e 22 mM de ácido láctico (grupo Am-AL – n = 10) e após adição de 10 µM de rianodina e 22 mM de ácido láctico (grupo Ri-AL – n = 10). Médias ± E.P. **D** corresponde à Fc registrada após adição de amiloride ou rianodina. a: diferença significativa em relação ao grupo Ctrl; b: diferença significativa em relação ao grupo AL; c: diferença significativa em relação ao grupo Ri-AL. (P < 0,05)..... 41
- Tabela 11.** Valores médios do tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl – n = 10), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL – n = 10), após adição de 1 mM de amiloride e 22 mM de ácido láctico (grupo Am-AL – n = 10) e após adição de 10 µM de rianodina e 22 mM de ácido láctico (grupo Ri-AL – n = 10). Médias ± E.P. **D** corresponde à Fc registrada após adição de amiloride ou rianodina. a: diferença significativa em relação ao grupo Ctrl; b: diferença significativa em relação ao grupo AL. (P < 0,05)..... 42

## SUMÁRIO.

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Características Gerais do Tecido Cardíaco de Peixes Teleósteos.....	2
1.2. Acoplamento Excitação-Contração Cardíaco.....	6
1.3. Relaxamento Cardíaco.....	10
1.4. Acidose <i>versus</i> contratilidade cardíaca.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Material.....	17
3.1.1. Posição Sistemática da Espécie.....	17
3.1.2. Considerações sobre a Espécie Estudada.....	18
3.1.3. Coleta e Manutenção em Laboratório.....	18
3.2. Métodos.....	19
3.2.2. Protocolos Experimentais.....	20
3.2.2.1 Efeito do ácido láctico.....	20
3.2.2.2. Papel do cálcio extracelular.....	21
3.2.2.3. Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).....	21
3.2.2.4. Papel do Retículo Sarcoplasmático (RS).....	22
3.2.2.5. Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ (NHE).....	23
3.2.3. Forma de apresentação dos dados.....	23
3.2.4. Tratamento estatístico dos dados.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Efeito do ácido láctico.....	25
4.2. Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).....	31
4.3. Papel do cálcio extracelular.....	35

4.4. Papel do Retículo Sarcoplasmático.....	39
4.5. Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ (NHE).....	43
5. DISCUSSÃO.....	47
5.1. Efeito do tempo de exposição e os efeitos da acidose láctica.....	47
5.2. Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).....	50
5.3. Papel do cálcio extracelular.....	52
5.4. Papel do Retículo Sarcoplasmático.....	53
5.5. Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ (NHE).....	56
5.6. Considerações finais.....	58
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

## 1. INTRODUÇÃO.

Os corações dos vertebrados são bombas notáveis que geram forças mecânicas que promovem a distribuição de nutrientes essenciais, metabólitos e outras substâncias pelo sangue e para os tecidos corpóreos a uma taxa e magnitude compatíveis às demandas do sistema de distribuição (LILLYWHITE et al., 1999). Para que o coração possa exercer sua função precípua, o débito cardíaco deve ser estreitamente regulado, o que envolve não apenas ajustes cronotrópicos, mas também toda uma série de modificações na contratilidade cardíaca (FARRELL & JONES, 1992).

Os vertebrados inferiores apresentam uma grande diversidade de tamanhos, adaptações ecológicas, estilos de vida, além de peculiaridades metabólicas, o que faz com que a demanda imposta ao sistema cárdio-respiratório destes animais seja muito variável, implicando em modificações na morfologia e fisiologia desses sistemas (MUÑOZ-CHÁPULI & HAMLETT, 1996). Conforme enfatizado por Johansen & Burggren (1980), um coração de vertebrado não é inferior ao outros vertebrados, mas sim específico para um animal que tenha uma organização a ele apropriada e que apresente padrões bem definidos de comportamento e de interação com seu ambiente.

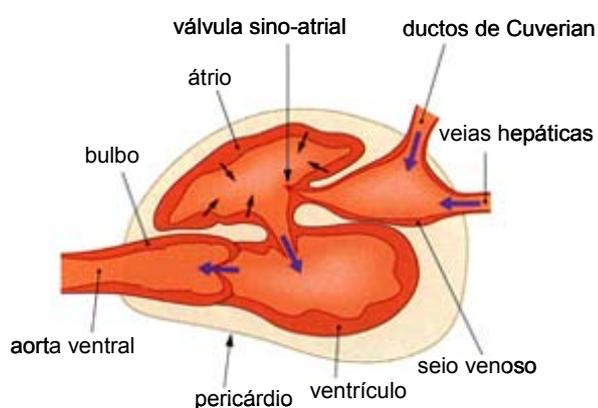
O coração dos vertebrados ectotérmicos está sujeito a maiores alterações nas taxas extracelulares de gases, *status* ácido-base e temperatura do que o coração dos animais endotérmicos. Esta particularidade decorre, fundamentalmente, das flutuações ambientais, por vezes súbitas e não previsíveis, que estão submetidos. Segundo Driedzic & Gesser (1994), as características da contratilidade são influenciadas por inúmeros fatores impactantes na performance cardíaca e os mecanismos celulares envolvidos diretamente na contratilidade cardíaca (o acoplamento excitação-contração ou acoplamento E-C) devem ser refinadamente regulados para atender às demandas impostas pelo ambiente.

Levando-se em conta a provável diferença existente entre o coração de espécies endotérmicas e ectotérmicas no que concerne às contribuições relativas entre o fluxo de cálcio através da sarcolema e, também, da sua liberação e tomada pelo retículo sarcoplasmático, é imprescindível um conhecimento pormenorizado do acoplamento excitação-contração em peixes.

### 1.1. Características Gerais do Tecido Cardíaco de Peixes Teleósteos.

Segundo Driedzic & Gesser (1994), os mecanismos contráteis, ou seja, a interação acto-miosínica e sua regulação pelo cálcio, parecem ser similares nos diferentes grupos de vertebrados (para uma revisão completa, ver BERS, 2001). Porém, distinções anatômicas e estruturais existentes entre os corações de peixes e mamíferos com relação ao tamanho relativo dos miócitos, à presença ou não de túbulos transversos (túbulos-T), à ocorrência e distribuição do retículo sarcoplasmático (RS) e ao arranjo das miofibrilas, são base para importantes diferenças fisiológicas, particularmente sobre a origem do cálcio a ser utilizado pelo aparato contrátil (TIBBITS et al., 1991).

O coração dos peixes teleósteos é um órgão constituído de 4 câmaras em série, contido dentro do saco pericárdico (figura. 1). Em conjunto, o seio venoso, o átrio, o ventrículo e o bulbo arterioso elástico aumentam a energia potencial e cinética do sangue (FARRELL & JONES, 1992).



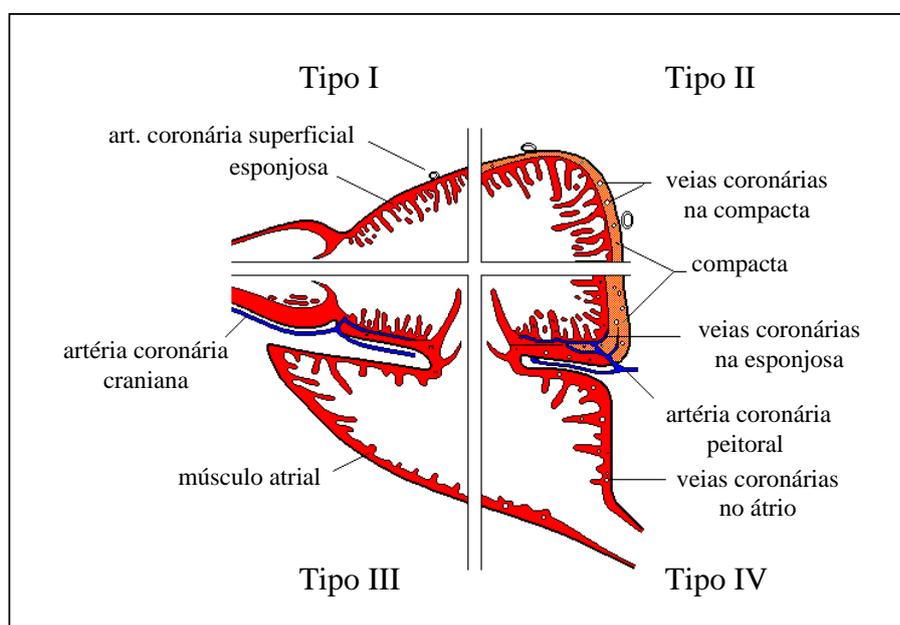
**Figura 1.** Esquema ilustrativo do coração de um peixe teleósteo.

O seio venoso é uma câmara de paredes finas, de aproximadamente 60-90  $\mu\text{m}$  de espessura e volume similar ao do átrio. Recebe sangue venoso através dos ductos pareados de Cuvierian, veias hepáticas e veia jugular anterior. O principal tecido componente da parede do seio é o tecido conjuntivo, com cobertura endotelial interna e epicardial externa. A quantidade de músculo presente no seio venoso varia consideravelmente entre as espécies. O principal papel do seio venoso está relacionado ao início e controle dos batimentos cardíacos, pois é o sítio do tecido marcapasso especializado (equivalente ao nodo sino-atrial dos mamíferos) (FARRELL & JONES, 1992).

Os peixes de respiração aquática possuem um único átrio. O átrio é uma câmara de formato irregular, com parede trabeculada. Seu volume é similar ou maior que o volume ventricular. Sua massa geralmente constitui 8-25% da massa do ventrículo e 0.01-0.03% da massa corpórea. O átrio é separado do ventrículo pela válvula atrioventricular, suportada por um anel de tecido cardíaco (FARRELL & JONES, 1992).

O ventrículo exibe uma grande variabilidade intra-específica em relação a sua massa, morfologia, histologia e vascularização. De acordo com Santer (1985), não existe uma forma típica para o ventrículo dos peixes. Da mesma forma, não existe um padrão estrutural.

Os ventrículos possuem duas formas básicas: uma com arranjo de músculos em trabéculas, que se estende por todo o ventrículo formando uma rede de aspecto esponjoso, a esponjosa; a segunda, externa, envolvendo a esponjosa, denominada compacta, associada com a circulação coronariana. Tota (1989) propôs quatro categorias principais baseadas na existência e arranjo das camadas esponjosa e compacta. As principais características que distinguem as quatro categorias de ventrículos entre si são a extensão da esponjosa em relação à compacta e o padrão de vascularização (figura. 2).



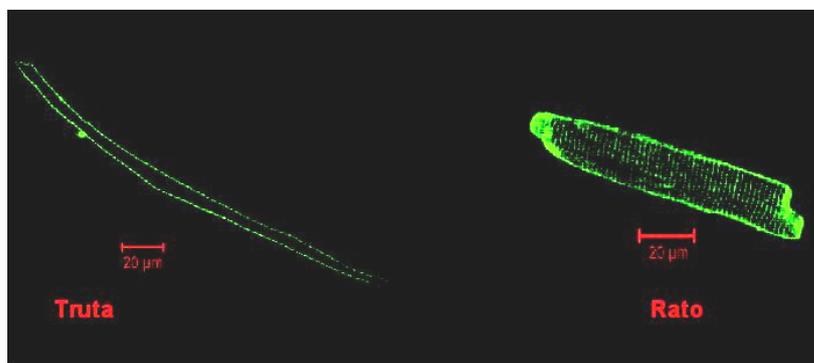
**Figura 2.** Ilustração esquemática das principais características que distinguem as 4 categorias de ventrículos em peixes.(extraída de FARRELL & JONES, 1992).

De acordo com Farrell & Jones (1992), a maioria das espécies de peixes possui apenas ventrículos do tipo I. O ventrículo do tipo I possui apenas miocárdio esponjoso. As três outras categorias (tipos II, III e IV) possuem tecido miocárdico compacto e esponjoso, bem como capilares no miocárdio. O tipo II é caracterizado pelos capilares da

circulação coronariana apenas na compacta. Nos ventrículos dos tipos III e IV, a circulação coronariana atinge a esponjosa bem como a compacta. A diferença entre os tipos III e IV é que o tipo III possui menos de 30% de tecido compacto. Os ventrículos que possuem mais que 30% de compacta e coronárias na esponjosa são arbitrariamente descritos com tipo IV.

Algumas características distinguem as células musculares cardíacas de peixes (miócitos) daquelas dos mamíferos. Tais diferenças, segundo Farrell & Jones (1992) e Tibbits et al., (1991) incluem:

- pequeno tamanho (1-12.5  $\mu\text{m}$ ) em relação aos dos mamíferos (10-25  $\mu\text{m}$ ) (figura.3);
- limitado desenvolvimento anatômico do retículo sarcoplasmático;
- arranjo periférico das miofibrilas;
- quantidade variável de mioglobina intracelular.



**Figura 3.** Imagens confocais de miócitos ventriculares de truta e de rato, marcados com di-8-ANEPPS (indicador fluorescente lipofílico) (extraída de SHIELS & WHITE, 2005).

Dentre as vantagens funcionais da ocorrência de um miócito de tamanho reduzido estão a menor distância de difusão do exterior para o centro da célula e a maior razão entre a área sarcolemal superficial e o volume intracelular (maior razão superfície/volume), de grande importância para a troca de substâncias, como o cálcio, entre os espaços intra e extracelulares (DRIEDZIC & GESSER, 1994; VORNANEN, 1997). De acordo com Forbes & Sperelakis (1971), animais com miócitos de diâmetro inferior a 5  $\mu\text{m}$  conseguem manter um acoplamento E-C adequado sem a necessidade de utilizar reservas intracelulares para diminuir as distâncias difusionais. Contudo, menores diâmetros provavelmente significam maior resistência elétrica (RANDALL, 1968) e velocidade de condução mais lenta, apesar do diâmetro das células do tecido marca-passo e daquelas especializadas em condução ser maior que dos demais miócitos em peixes.

Além do diâmetro dos miócitos, os túbulos-T, que correspondem a profundas invaginações da sarcolema (SL), que auxiliam na propagação do potencial de ação (PA)

para o interior da célula (TIBBITS et al., 1990) e diminuem a distância difusional do cálcio do meio extra para o intracelular e vice-versa (BERS, 1991), também distinguem anatomicamente os miócitos de mamíferos dos demais vertebrados. Isso se deve ao fato dos peixes, como todos os demais ectotérmicos (KEEN et al., 1992; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; DRIEDZIC & GESSER, 1994) e também as aves (FORBES & SPERELAKIS, 1971), não apresentarem túbulos-T. Conseqüentemente, as maiores taxas de difusão de cálcio devido à presença de túbulos-T nos mamíferos são, em parte, contrabalançadas pelo aumento da taxa de difusão proporcionada pelo menor diâmetro dos miócitos de peixes. Segundo Bers (2001), de 30 a 50% da área sarcolemal ventricular de mamíferos concentra-se nos túbulos-T, onde também é observada uma maior densidade de canais de cálcio.

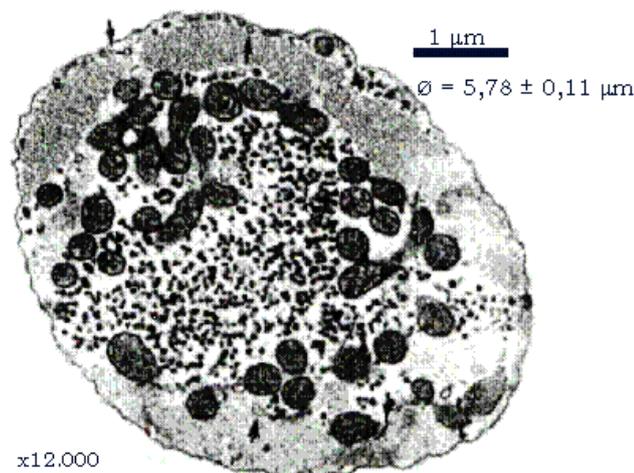
Outra característica diferenciadora dos miócitos de peixes em relação aos de mamíferos refere-se à abundância e distribuição do retículo sarcoplasmático (RS), uma organela das células musculares especializada na acumulação de cálcio e sua liberação para o aparato contrátil. O RS é relativamente bem desenvolvido em aves e mamíferos, especialmente em ratos, refletindo a grande importância funcional do cálcio intracelular para sua contração miocárdica (CHAPMAN, 1983; BERS, 1987, 1989, 1991, 2001; GWATHMEY & MORGAN, 1991).

O desenvolvimento do RS varia entre as espécies de peixes, apesar de na maioria dos teleósteos (DRIEDZIC & GESSER, 1988, 1994; MAYLIE & MORAD, 1995; CHUGUN et al., 1999) e particularmente nos elasmobrânquios (TOTA, 1989) apresentar-se distribuído de forma esparsa. Essa menor dependência em relação ao RS como fornecedor de cálcio às miofibrilas também ocorre nos demais vertebrados ectotérmicos, como anfíbios e répteis (FORBES & SPERELAKIS, 1971), e também nos estágios iniciais do desenvolvimento ontogenético de mamíferos, como visto em ratos neonatos (AHO & VORNANEN, 1998). O RS corresponde a aproximadamente 0,5% do volume do miócito de peixes e anfíbios, diferindo dos cerca de 7,3% observados em ratos (HELLE, 1983; LEKNES, 1984).

Adicionalmente, mesmo em espécies de peixes que apresentam um RS relativamente desenvolvido como a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, esta organela desempenha um papel pouco relevante como fornecedora de cálcio para o aparato contrátil em temperaturas e frequências cardíacas observadas *in vivo* (HOVE-MADSEN & GESSER, 1989; HOVE-MADSEN, 1992; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; GESSER, 1996; PELOUCH & VORNANEN, 1996; SHIELS & FARRELL, 1997; AHO & VORNANEN, 1998; HOVE-MADSEN et al., 1998; LILLYWHITE et al., 1999), apesar de alguns estudos também terem indicado que esta organela pode contribuir com a geração de força em condições fisiológicas (HARWOOD et al., 2000; HOVE-MADSEN et al., 2001).

Neste sentido, uma participação direta do RS para a geração de força também já foi observada em frequências cardíacas fisiologicamente relevantes para diversos peixes da família Scombridae, como os atuns tropicais *Katsuwonus pelamis* (KEEN et al., 1992, 1994; TIBBITS et al., 1992a; LILLYWHITE et al., 1999) e *Thunnus albacares* (FREUND, & BLOCK, 1998; SHIELS et al., 1999), e também em seus parentes de ambientes temperados, como as cavalas do Pacífico, *Scomber japonicus* (SHIELS & FARRELL, 2000) e do Atlântico, *Scomber scombrus* (SANTER, 1985;), permitindo que estes peixes mantenham altas frequências cardíacas durante o exercício sem detrimento significativo da contratilidade (KORSMEYER et al., 1997).

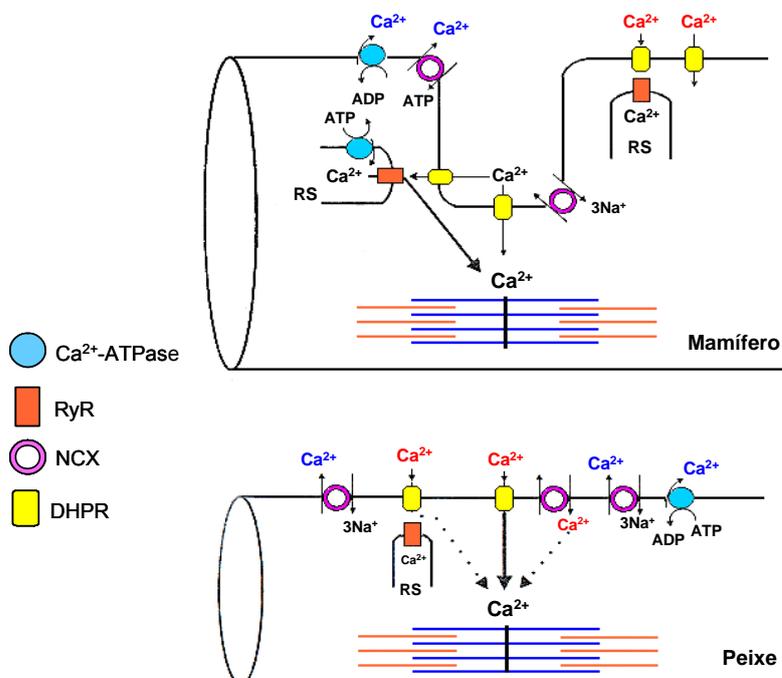
Por fim, as miofibrilas da maioria dos peixes, embora menos abundantes que em mamíferos, apresentam geralmente uma distribuição periférica nos miócitos (SANTER & COBB, 1972; VORNANEN, 1997). Essa localização das miofibrilas na região mais próxima à SL permite que, apesar da ausência de túbulos-T, a difusão de cálcio do espaço extracelular até o aparato contrátil, crítica para a performance do músculo cardíaco, seja facilitada (FARRELL & JONES, 1992). A figura 4 ilustra as características anatômicas diferenciadoras dos miócitos de peixe anteriormente citadas.



**Figura 4.** Fotomicrografia eletrônica de um corte transversal do miócito ventricular de carpa cruciana, *Carassius carassius* (aumento de 12.000x). As setas apontam para o RS, pobremente desenvolvido. Notar o pequeno diâmetro dos miócitos ( $5,78 \pm 0,11 \mu\text{m}$ ), associado à ausência de túbulos-T e à disposição periféricas das miofibrilas (modificado de VORNANEN, 1997).

## 1.2. Acoplamento Excitação-Contração Cardíaco

A seqüência de eventos que ocorre desde a despolarização do miócito até a contração muscular, que se segue à sensibilização dos miofilamentos ao cálcio, é denominada acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C). Particularidades anatômicas, como o pequeno diâmetro dos miócitos, associado à ausência de túbulos-T e ao desenvolvimento anatômico limitado do RS resultam em peculiaridades no acoplamento E-C no miocárdio de vertebrados inferiores acerca da origem do cálcio a ser utilizado pelo aparato contrátil, como veremos em detalhe mais adiante (muito elucidativas a este respeito são as revisões feitas por TIBBITS et al., 1992a e VORNANEN et al., 2002). Um esquema geral do acoplamento E-C cardíaco é mostrado na figura 5, que compara o modelo desenvolvido para mamíferos àquele conhecido até o momento para peixes, baseado no descrito para teleósteos.



**Figura 5.** Esquema geral do mecanismo de acoplamento E-C do músculo cardíaco, comparando o modelo existente em mamíferos (A) com o proposto para teleósteos (B). A figura também ilustra algumas diferenças entre a estrutura dos miócitos de peixes e mamíferos, como variações no diâmetro das células, distribuição e abundância do RS e existência de túbulos-T. As linhas pontilhadas sugerem um possível papel das fontes de cálcio. DHPR: canal de dihidropiridina; SL: sarcolema; RS: retículo sarcoplasmático; NCX: trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (modificado de TIBBITS et al., 1992a).

A principal diferença entre ectotérmicos e mamíferos está relacionada à origem do cálcio que chega às miofibrilas. É sabido há mais de um século (RINGER, 1883 apud BERS, 2001) que o cálcio extracelular é essencial à contração miocárdica. Tem sido

mostrado que um influxo de cálcio pela sarcolema (SL), tanto através do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) como de canais voltagem-dependentes tipo L (lentos) sensíveis às dihidropiridinas (DHP), desempenha um papel crítico na regulação da contratilidade (BERS et al., 1988; MIKAMI et al., 1989; ROMANIN et al., 1992; NAKAI et al., 1997).

De acordo com Fabiato et al. (1983), este influxo transarcolemal de cálcio dispara, em mamíferos, a liberação de uma quantidade ainda maior deste íon do RS, através de canais de cálcio denominados canais de rianodina (RyR), mecanismo denominado liberação de cálcio cálcio-induzida (BERS, 1987). Além disso, apesar de mais significativo na musculatura lisa, o efluxo de cálcio do RS também pode ocorrer no miocárdio por meio da elevação dos níveis intracelulares de inositol (1,4,5) trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) provocado pela ligação de um agonista, como as catecolaminas, à SL (BERRIDGE, 1993).

Não obstante a magnitude do influxo de cálcio através dos canais L da SL ser variável entre as espécies de mamíferos (BERS, 1985), a maioria dos estudos indica que esta entrada transarcolemal de cálcio é insuficiente para permitir a contração (CHAPMAN, 1983; DRIEDZIC & GESSER, 1994; BASSANI et al., 1994b, 1996). Assim, o cálcio liberado do RS constitui-se na fonte principal deste íon para a contração no coração de todos os mamíferos estudados (BERS, 1985; WIER, 1990; GWATHMEY & MORGAN, 1991; McCALL & ORCHARD, 1991; BASSANI et al., 1992, 1993, 1994a, b; BERS et al., 1993; KLAUTZ et al., 1997).

Por outro lado, no coração dos vertebrados inferiores a situação parece ser muito diferente. Tibbits et al. (1991) sugeriram que no miocárdio de anfíbios o cálcio liberado do RS não é suficiente para promover a contração, além de ter sido contestada a ocorrência de liberação de cálcio-cálcio-induzida no ventrículo destes animais (FABIATO & FABIATO, 1978; FABIATO, 1983). A contração ventricular tanto em anfíbios (MORAD & ORKAND, 1971; BERS, 1985; GWATHMEY & MORGAN, 1991; MILL et al., 1992) quanto na maioria dos peixes (DRIEDZIC & GESSER, 1988; HOVE-MADSEN & GESSER, 1989; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; KEEN et al., 1994; GESSER, 1996; RANTIN et al., 1998; COSTA et al., 2004) parece ser relativamente insensível ao alcalóide rianodina (inibidor da função do RS), mesmo quando utilizado em concentrações que comprovadamente bloqueiam a liberação de cálcio do RS (SUTKO & AIREY, 1996) em experimentos conduzidos utilizando-se tanto frequências estimulatórias quanto temperaturas fisiológicas para cada animal.

Tibbits et al. (1992a) enfatizam que, em anfíbios, a importância relativa do fluxo de cálcio através da SL pode também ser indicada por um P.A. mais duradouro, resultante de uma fase platô mais pronunciada ( $723 \pm 106$  ms à temperatura ambiente), o mesmo ocorrendo na maioria dos peixes investigados até o momento (e.g.  $556 \pm 56$  ms a 20

°C em carpa cruciana, *Carassius carassius*, VORNANEN, 1989). Isso contrasta com os resultados obtidos para mamíferos, nos quais até mesmo espécies que apresentem um P.A. de duração relativamente longa, sua duração não chega a atingir a metade do valor observado em anfíbios (e.g.  $372 \pm 14$  ms a 23 °C em coelhos).

Segundo Driedzic & Gesser (1994), um P.A. mais duradouro resulta na manutenção de um potencial de membrana positivo e, conseqüentemente, na maior permanência dos canais de cálcio voltagem-dependentes no estado aberto, além de favorecer um possível influxo de cálcio através do trocador NCX (TIBBITS et al., 1992b). Isso sugere que a duração e a amplitude da contração sejam fortemente determinadas pela despolarização da membrana nos ventrículos de vertebrados inferiores.

Devido a essas observações, associadas a uma maior razão superfície/volume, que também proporciona uma maior densidade de receptores de DHPR (THOMAS et al., 1996), é de se esperar que no coração de vertebrados inferiores o transporte transarcolema de cálcio seja suficiente para permitir a contração (FORBES & SPERELAKIS, 1971; SHEPHERD & KAVALER, 1986; VORNANEN, 1997), a menos que outra organela, como a mitocôndria, também venha a contribuir para a regulação batimento-a-batimento da concentração intracelular de cálcio. Deve-se assinalar que esta possível participação direta da mitocôndria no acoplamento E-C tem sido descartada para o coração de mamíferos, baseada em uma variedade de argumentos cinéticos e farmacológicos (FABIATO, 1983; DRIEDZIC & GESSER, 1994; BASSANI et al., 1996). Contudo, a validade destes argumentos ainda necessita ser verificada em peixes.

Pelos motivos anteriormente mencionados, o papel do RS na geração de tensão pelo coração da maioria dos vertebrados inferiores é normalmente desconsiderado (TIBBITS et al., 1990; MØLLER-NIELSEN & GESSER, 1992; HOVE-MADSEN & TORT, 1998). Contudo, importante enfatizar, é o fato da participação do RS no manejo de cálcio de peixes de ambientes tropicais ter-se mostrado mais variável, não seguindo uma correlação tão direta entre o nível de atividade do animal *versus* a funcionalidade do RS como descrita para animais de ambientes temperados. Ilustrativos a este respeito são os resultados obtidos para espécies Neotropicais como os teleósteos traíra, *Hoplias malabaricus* (OLLE et al., 2003; RIVAROLI et al., 2006), pacu, *Piaractus mesopotamicus* (ANELLI-JR et al. 2004), curimatá, *Prochilodus lineatus* (RIVAROLI et al., 2006), e muçum, *Synbranchus marmoratus* (ROCHA et al. 2006, 2007), e para o dipnóico pirambóia, *Lepidosiren paradoxa* (COSTA et al., 2004), cujos RS mostraram-se altamente funcionais, a despeito dos diversos níveis de atividade das espécies em questão. Dessa forma, não pode ser descartada a hipótese de que há um componente filogenético determinando a funcionalidade do RS em peixes.

### 1.3. Relaxamento Cardíaco.

Tibbits et al. (1992a) destacam que tanto em mamíferos como em peixes o relaxamento cardíaco ocorre mediante uma redução da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  até o nível diastólico de cerca de 100 nM. Teoricamente (HASENFUSS et al., 1996; MISQUITTA et al., 1999), a diminuição do cálcio livre pode ser obtida por sistemas de transporte localizados em três diferentes compartimentos celulares: 1) a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA); 2) o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) e a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da sarcolema e 3) a mitocôndria.

No coração de mamíferos, a SERCA e o NCX são os principais mecanismos para reduzir a concentração citosólica de cálcio a fim de promover o relaxamento máximo. De acordo com Bers (1991), sob condições normais, cerca de 70% do cálcio citosólico é removido pelo RS através da SERCA e o restante pelo NCX sarcolemal, o qual constitui-se no principal meio de efluxo deste íon da célula. Além disso, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da SL e a tomada mitocondrial de cálcio aparentemente desempenham um papel muito reduzido no relaxamento cardíaco de mamíferos (BASSANI et al., 1996; MARENGO et al., 1997).

Os peixes, por sua vez, devido ao fato de apresentarem um RS menos desenvolvido e uma maior razão superfície/volume, diferem dos mamíferos em termos da contribuição relativa dos mecanismos para a movimentação de cálcio também no relaxamento miocárdico. Nos vertebrados inferiores, o cálcio que entra na célula proveniente do fluxo transsarcolemal é removido do citosol durante o relaxamento cardíaco basicamente através do NCX e da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemais (TIBBITS et al., 1991; THOMAS et al., 1996; XUE et al., 1999), o primeiro constituindo-se no principal mecanismo em teleósteos (DRIEDZIC & GESSER, 1994).

Portanto, durante o ciclo cardíaco de peixes podemos observar uma importância reduzida do RS tanto como fornecedor quanto como armazenador de cálcio, o oposto ocorrendo com a SL. Contudo, essa afirmação é baseada prioritariamente na literatura referente a peixes de ambientes temperados, tornando imprescindível a obtenção de um conhecimento pormenorizado do acoplamento E-C cardíaco de peixes neotropicais numa tentativa de verificar a validade destes argumentos para esses animais.

Conforme descrito anteriormente, a ativação dos miofilamentos durante o acoplamento E-C ocorre em resposta a um aumento da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual pode depender tanto da mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular proveniente do RS quanto do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pela SL através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes (canais L) e do NCX (HOVE-MADSEN et al., 2000). Por outro lado, o músculo cardíaco relaxa por meio da redução dos níveis citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  até os níveis diastólicos de repouso principalmente

por seu transporte para o espaço extracelular através da SL (especialmente via NCX) ou para o RS pela atividade bombeadora da SERCA.

O tempo gasto para o aumento e o decréscimo da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , assim como a quantidade deste íon que é ciclada batimento-a-batimento, dependem diretamente do grau de atividade dos mecanismos transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  em cada compartimento, que varia de acordo com a espécie e a temperatura (GWATHMEY & MORGAN, 1991; VORNANEN, 1998).

#### 1.4. Acidose *versus* contratilidade cardíaca.

A regulação da concentração do íon hidrogênio é fundamental em razão de que todas as atividades enzimáticas do organismo são influenciadas pela sua distribuição nos meios intra e extracelulares. Mudanças na concentração do íon  $\text{H}^+$  podem alterar diversas funções celulares essenciais à homeostasia. Esse íon é regulado precisamente por sistemas tamponantes que envolvem: a eliminação pelos rins, tamponamento sanguíneo, celular, e pulmonar (GUYTON, 2002).

O efeito inotrópico negativo no coração dos vertebrados, produzido por acidose é reconhecido há muitos anos e explorado por uma diversidade de autores (FOEX & FORDHAM, 1972; FABIATO & FABIATO, 1978; GESSER & POUPA, 1978, 1981, 1979; MATTIAZZI et al., 1979; GESSER & JORGENSEN, 1982; FARRELL et al., 1983; BLANCHARD & SOLARO, 1984; MARBAN & KUSUOKA, 1987; FARRELL et al., 1988; CINGOLANI & MARBAN 1990; ORCHARD et al., 1991; KALININ & GESSER, 2002).

De acordo com Driedzic & Gesser (1994), a magnitude do efeito, bem como a capacidade de tolerância à acidose, são bastante variáveis entre os grupos animais. Os grupos de vertebrados, estudados por diferentes autores, apresentaram diferenças em relação à recuperação da performance cardíaca frente à acidose: recuperação absoluta (GESSER & JORGENSEN, 1982; MATTIAZZI & CINGOLANI, 1977a); recuperação parcial (GUESSER & JORGENSEN, 1982, MATTIAZZI & CINGOLANI, 1977b; Perez, 1993) e recuperação ausente (GESSER & JORGENSEN, 1982; HOGLUND & GESSER, 1987).

Alguns trabalhos têm demonstrado que algumas espécies de peixes são intolerantes à acidose, como a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, o “ocean pout”, *Zoarces americanus*, e o “sea raven”, *Hemitripterus americanus*, que durante hipercapnia severa (3-10% de  $\text{CO}_2$ ) demonstram decréscimos de 14–58% na performance cardíaca, enquanto espécies como enguias (*Anguilla anguilla*) e esturijões (*Acipenser transmontanus*)

são tolerantes à acidose hipercápnica de curta duração (CROCKER et al., 2000; MCKENZIE et al., 2002; HANSON et al., 2007, 2009).

Alguns ectotérmicos podem permanecer anóxicos por longos períodos de tempo e o principal fator que limita a duração da anoxia é a acumulação de produtos ácidos e seus efeitos no balanço ácido-base (JACKSON, 2004). Tartarugas, como outros vertebrados, dependem da produção anaeróbica de energia e isso leva à produção de lactato e prótons como produtos finais (HOCHACHKA & MOMMSEN, 1983). Um exemplo extremo é a tartaruga pintada *Chrysemys picta* que pode alcançar altos níveis plasmáticos de lactato (150-200 mmol L<sup>-1</sup>) depois de alguns meses de submersão (ULTSCH & JACKSON, 1982; JACKSON et al., 2000). Esta capacidade para manejar esta grande carga ácida e permanecer em condições ácido-base viáveis é provavelmente devida à formação de um complexo entre o cálcio e o lactato na carapaça e esqueleto, funcionando como um mecanismo tamponador (JACKSON, 2000; 2002; 2004). Uma estratégia similar foi observada no jacaré do papo amarelo (*Caiman latirostris*), no qual os osteodermas seqüestram o lactato durante a acidose láctica que ocorre durante períodos de submersão (JACKSON et al., 2003).

Em peixes, a intensa atividade pode também levar ao decréscimo acentuado do pH plasmático, que deve permanecer deprimido por muitas horas até retornar às condições de repouso. É bem conhecido que o exercício intenso induz uma produção acelerada de lactato e íons H<sup>+</sup> no músculo esquelético, especialmente em fibras glicolíticas de contração rápida, por meio da via glicolítica anaeróbica. A acidose intramuscular ocorre quando a quebra do ATP excede o suprimento de ATP. De acordo com Wang et al. (1996), o lactato desempenha um papel importante tanto na regulação metabólica quanto no equilíbrio ácido-base em diferentes espécies. Em mamíferos, por exemplo, o efluxo de lactato via corrente sanguínea para ser metabolizado pelo fígado (i.e., ciclo de Cori) parece ser a rota principal, mas sua oxidação no músculo cardíaco e em músculos esqueléticos de oxidação lenta também pode ocorrer, e até mesmo a oxidação e a glicogênese no interior do próprio músculo branco é possível. Contudo, a liberação de lactato pelo músculo tem sido demonstrada como uma grande causa de seu total desaparecimento (GADDEN, 1989; BROOKS, 1991; POOLE & HALESTRAP, 1993). Nos peixes, a situação parece ser completamente diferente.

A truta arco-íris tem sido extensivamente usada como modelo de estudo na chamada lactoacidose pós-exercício (TURNER & WOOD, 1983, WANG et al., 1996) e de acordo com Wang et al. (1996), é consenso que a liberação de lactato para o sangue é muito menor, que o ciclo de Cori não ocorre (MILLIGAN & GIRARD, 1993) e que a maioria do lactato e o H<sup>+</sup> permanecem no músculo para serem oxidados lentamente ou resintetizados em glicose *in situ*, o que deve representar uma estratégia para minimizar a

acidose láctica no compartimento extracelular pobremente tamponado dos peixes. Contudo, os detalhes deste metabolismo não são claramente conhecidos e precisam ser estendidos para outras espécies.

A capacidade do miocárdio em recuperar a contratilidade durante a acidose é variável e espécie-específica. Gesser & Jorgensen (1982) encontraram um declínio e subsequente recuperação da contratilidade em tiras ventriculares de linguado (*Platichthys flesus* L.) e tartaruga (*Pseudemys scripta* L.) e decréscimo sustentado em bacalhau (*Gadus morhua* L.) e na truta arco-íris durante hipercapnia (13-15% CO<sub>2</sub>). Para Gesser & Poupa (1978), a capacidade de tolerar a acidose parece ausente nos peixes de respiração aquática obrigatória, pois o CO<sub>2</sub> é mais solúvel em água do que no ar. Assim, os animais de respiração aérea parecem mais sujeitos a acidose do que os de respiração aquática.

Na maioria dos peixes estudados, um decréscimo no pH extracelular evoca um decréscimo no pH intracelular em tecidos como o coração, músculo branco e fígado (MILLIGAN & FARRELL, 1986; MILLIGAN & WOOD, 1986; MCKENZIE et al., 2002). Porém, o cascudo *Pterygoplichthys pardalis*, o esturjão *Acipenser transmontanus* e o muçum *Synbranchus marmoratus*, apresentam um padrão incomum de proteção do pH intracelular durante acidose extracelular severa (HANSON, 2009). Em estudo recente, Hanson et al. (2009) demonstraram que em preparações *in situ* com corações perfundidos, *P. pardalis* exibiu somente um decréscimo moderado (~35%) na performance cardíaca quando expostos a 7.5% CO<sub>2</sub> e a mesma foi totalmente restaurada em seis dos sete corações testados.

A resposta do músculo cardíaco à acidose extracelular depende não só do pH da solução, mas também do tipo de acidose imposta, como apontado por Jacson et al. (1991). De acordo com esses autores, a acidose respiratória tem um rápido e pronunciado efeito na função cardíaca da tartaruga devido à rápida entrada pela membrana celular e acidificação do citoplasma pelo CO<sub>2</sub>, enquanto ácidos orgânicos, como o ácido láctico, têm efeitos importantes tanto no pH quanto na função celular, embora sua taxa de penetração seja mais lenta do que a do CO<sub>2</sub>. Essa distinção é importante porque ambos acumulam-se *in vivo* durante submersão prolongada em tartarugas e outros animais mergulhadores e depois de exercícios físicos extenuantes em muitas espécies.

Os efeitos da natação sustentada por 60 a 90 dias a 20 cm.s<sup>-1</sup> (1-2 comprimento do corpo.s<sup>-1</sup>) em espécimes juvenis de matrinxã foram estudadas por Oba (2006). Esta autora descreveu um significativo aumento do lactato plasmático, de ~0,5 para 0.9 μmol.mL<sup>-1</sup> e de ~0,4 to 0,6 μmol.mL<sup>-1</sup>, depois de 60 e 90 dias de natação sustentada, respectivamente.

Em mamíferos, a redução inicial na força de contração (Fc) é seguida por uma recuperação absoluta, que ocorre apesar da persistência da acidose (PEREZ et al.,

1993). Diversos estudos com modelos animais mamíferos se propuseram a elucidar as causas da recuperação da contratilidade cardíaca verificada durante a acidose láctica. As hipóteses mais significativas para explicar a recuperação da contratilidade são a restituição do pH e, conseqüentemente, da responsividade miofibrilar, bem como o aumento na concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (ORCHARD et al., 1987, 1990, 1991; CINGOLANI et al., 1990; HULME & ORCHARD, 1998; SOLARO et al., 1998; NOMURA et al., 2002).

Segundo Hulme & Orchard (1998), a acidose em miócitos ventriculares de rato produz aumento do  $Ca^{2+}$  diastólico, aumento da amplitude do  $Ca^{2+}$  transiente e redução do declínio do  $Ca^{2+}$  transiente. Esses efeitos permitem o aumento do estoque de  $Ca^{2+}$  do RS. O aumento no influxo de  $Na^+$ , por meio do acionamento do trocador  $Na^+/H^+$  (NHE), produz o acionamento do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) no seu modo reverso, o que também contribui para o aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  disponível às miofibrilas contrácteis (BOUNTRA & VAUGHAN-JONES, 1989; HARRISON et al., 1992).

No sapo *Buffo arenarum*, a redução da Fc parece menos pronunciada e a recuperação excede os valores iniciais (MATTIAZZI & CINGOLANI, 1977a). A redução da responsividade miofibrilar ao  $Ca^{2+}$  é o fator preponderante verificado na redução da Fc pós-acidose hipercápnica. A recuperação da Fc é independente da recuperação do pH e os mecanismos sarcolemais são os responsáveis pela recuperação, incluindo a redução do tamponamento miofibrilar e o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , devido ao influxo pelos canais L e, principalmente, ao acionamento do NCX no modo reverso pelo prolongamento do P.A. (SALAS et al., 2006).

*Brycon cephalus* (matrinxã) é um teleósteo reofílico Neotropical que exibe uma alta capacidade natatória durante a migração e a alimentação. São muito importantes comercialmente e encontram-se entre os peixes de escama mais esportivos da Amazônia (VAL & HONCZARIK, 1995). Quando são forçados a nadar em altas velocidades, ocorre uma grande produção de ácido láctico pelos músculos. Assim, os peixes fadigam-se rapidamente e apresentam uma série de respostas metabólicas que podem comprometer seu crescimento e desempenho (HACKBARTH, 2004).

As respostas cárdio-respiratórias do matrinxã à hipóxia progressiva foram estudadas por Olle (2007). A espécie é capaz de manter uma constante tomada de  $O_2$  sob tensão crítica de oxigênio de 35 mmHg, mas com uma baixa extração de  $O_2$  da corrente ventilatória (~56%) e uma significativa bradicardia foi demonstrada abaixo de 80 mmHg, com valores ~50% menores do que em normoxia (20 mmHg). Esses dados indicam que o matrinxã é uma espécie pouco tolerante a hipóxia.

A investigação das estratégias adotadas por diferentes grupos de vertebrados frente à acidose é fundamental para um completo entendimento dos mecanismos

fisiológicos de ajuste da contratilidade cardíaca. Tais informações são importantes para um entendimento mais amplo da multiplicidade de ajustes em miocárdios tolerantes à acidose, bem como podem servir para a elaboração de diferentes estratégias para a resolução de prejuízos para a saúde humana decorrentes da acidose láctica.

Em peixes, as respostas à acidose, particularmente à acidose láctica, ainda não foram completamente elucidadas. Diferentes razões para a redução e para a recuperação da contração têm sido propostas, contudo ainda não são conclusivas. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito da acidose láctica na contratilidade cardíaca do teleósteo neotropical de água doce matrinxã (*Brycon cephalus*).

## 2. OBJETIVOS

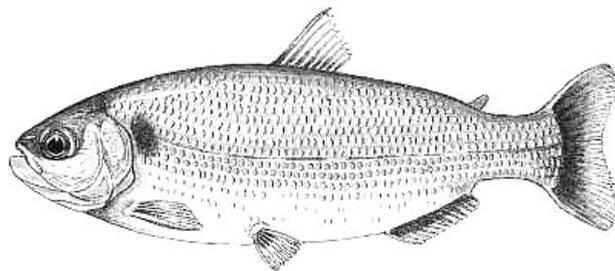
O presente trabalho teve como objetivo principal verificar o efeito da acidose láctica sobre a função contrátil do músculo cardíaco isolado do teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus*. Para tanto, preparações controle e expostas a 22 mM de ácido láctico foram utilizadas para a determinar os seguintes parâmetros:

- a. Efeito do tempo experimental sobre o desenvolvimento da força de contração (Fc) das tiras ventriculares.
- b. Efeitos da acidose láctica sobre o inotropismo cardíaco e os parâmetros tempo-dependentes.
- c. Dependência da contratilidade em relação ao cálcio extracelular durante a acidose láctica.
- d. Papel do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) na contratilidade cardíaca e durante acidose láctica.
- e. Papel do retículo sarcoplasmático (RS) na contratilidade cardíaca durante acidose láctica.
- f. Papel do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) na contratilidade cardíaca durante acidose láctica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

No presente estudo, foram utilizados exemplares adultos de ambos os sexos de matrinxã, *Brycon cephalus* (figura 6).



**Figura 6.** Representação de um exemplar de matrinxã, *Brycon cephalus*.

#### 3.1.1. Posição Sistemática da Espécie

Segundo a classificação de Britski (1972), a espécie ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Superordem: Ostariophysi

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Bryconinae

Gênero: *Brycon*

Espécie: *Brycon cephalus*.

### 3.1.2. Considerações sobre a Espécie Estudada.

O matrinxã, *Brycon cephalus* é um peixe teleósteo de água doce, nativo das bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins. É um peixe de escamas, com coloração cinza prata uniforme, com uma mancha escura arredondada na região humeral e nadadeiras alaranjadas, exceto a nadadeira caudal que é geralmente cinza escuro. Os dentes são fortes e multicuspidados, com várias fileiras na maxila superior. Os adultos raramente ultrapassam 80 cm de comprimento e 5 kg (VAL & HONCZARIK, 1995).

O matrinxã tem hábito alimentar onívoro, alimentando-se na natureza de sementes e frutos como a acapurana (*Campsiandra augustifolia*), bacaba (*Oenocarpus bacaba*), seringa barriguda (*Hevea spruceana*), seringa verdadeira (*Hevea brasiliensis*), taquari (*Mabea* sp.) e insetos. O desenvolvimento de reservas de gordura durante a estação de cheia é uma importante adaptação para sua sobrevivência na estação de seca. Em cativeiro aceita rações peletizadas bem como subprodutos agro-industriais (LOWE-MCCONNELL, 1975).

É uma espécie rústica e tem crescimento rápido. A maturação sexual ocorre em torno dos três anos de idade. É uma espécie migratória, ou de piracema, e sua reprodução em ambiente natural ocorre no início do período de enchente, entre dezembro e fevereiro. São muito importantes comercialmente e encontram-se entre os peixes de escama mais esportivos da Amazônia (VAL & HONCZARIK, 1995).

O matrinxã pode ser cultivado em sistema de cultivo extensivo e semi-intensivo, em monocultivo ou de preferência em policultivo com outras espécies. No cultivo alcança de 700 g até 1 kg no primeiro ano e 1,3 a 1,6 kg no segundo ano, o que corresponde ao tamanho comercializável já no primeiro ano e, portanto, é uma espécie com potencial para cultivo em cativeiro. Seu cultivo em longo prazo, porém, só será viável quando se dispuser de quantidade suficiente de alevinos através da desova induzida e do cultivo em massa dos mesmos (VAL & HONCZARIK, 1995).

### 3.1.3. Coleta e Manutenção em Laboratório.

Os exemplares de matrinxã utilizados no presente estudo foram gentilmente cedidos pelo Centro de Piscicultura Águas Claras, Município de Mococa, SP. Os peixes foram acondicionados em tanques com capacidade entre 25 e 50 litros e imediatamente

transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do DCF/UFSCar, onde os experimentos foram realizados.

Em laboratório, os peixes foram mantidos em tanques com capacidade de 1000 litros, dotados de circulação contínua de água, aeração constante e temperatura controlada ( $25 \pm 1$  °C), por um período mínimo de 30 dias. Estudos prévios (KALININ, 1996) demonstraram que esse período é suficiente tanto para a recuperação do estresse decorrente da coleta e transporte, como para a aclimatação às condições laboratoriais. Durante esse período os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada própria para peixes.

### 3.2. Métodos

As preparações experimentais foram efetuadas de acordo com os procedimentos adotados por Thomaz et al. (2009), descritos a seguir. Os animais de ambos sexos (peso =  $230 \pm 40$  g) foram sacrificados por secção medular, sendo pesados em seguida. O coração foi retirado e colocado em solução fisiológica gelada própria para teleósteos de água-doce, com a seguinte composição (mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 0,94 MgSO<sub>4</sub>, 30 NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 CaCl<sub>2</sub> e 2,5 glicose a 25° C. uma mistura carbogênica contendo 98% O<sub>2</sub> e 2 % CO<sub>2</sub> foi continuamente borbulhada na solução fisiológica.

Oportunamente o LiCl substituiu o NaCl na mesma proporção molar. A acidose láctica foi obtida pela adição de 22 mM de ácido láctico nos banhos (30ml), reduzindo o pH de 7,4 para 6,8.

Em todos os protocolos experimentais foram utilizadas preparações pares de tiras ventriculares obtidas do coração de um único peixe, após a retirada do bulbo arterioso e do átrio, para evitar contrações espontâneas do miocárdio. Cada uma das tiras ventriculares, com diâmetro entre 1 e 2 mm, foi transferida para um banho contendo 30 ml de solução fisiológica termostaticada a 25 °C, dotado de borbulhamento constante com a mistura carbogênica descrita acima.

Uma extremidade da tira foi fixada, por meio de uma espiral metálica, a um gancho construído na parte terminal de um eletrodo de estimulação de platina. A outra extremidade foi conectada, com um gancho metálico preso a outra espiral metálica, a um transdutor de força isométrica AECAD 0408 (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP) para que o traçado da contração isométrica e dos tempos de contração e relaxamento cardíacos fossem adquiridos e analisados pelo sistema informatizado Soft & Solutions (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP). Os eletrodos de estimulação foram acoplados a

estimuladores AVS 100D (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP), os quais geram pulsos elétricos quadrados com 8 ms de duração e uma voltagem 50% superior àquela necessária para que se atinja o limiar da resposta mecânica, permitindo assim a estimulação elétrica das tiras para o desenvolvimento da força de contração a diferentes taxas. Esses estimuladores possuem as mesmas especificações eletrônicas dos Grass SD9 (Quincy, Mass., USA). A figura 7 ilustra o set experimental utilizado para a obtenção dos resultados.

### 3.2.2. Protocolos Experimentais.

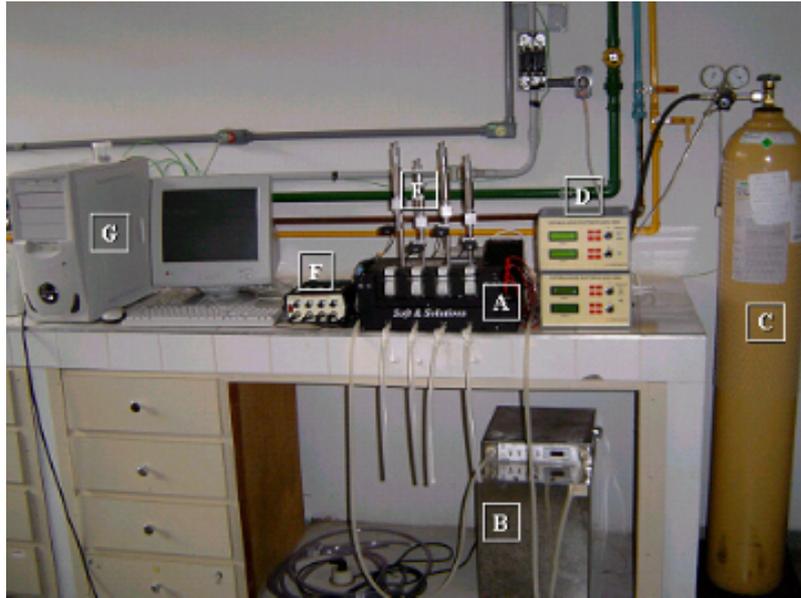
As tiras ventriculares foram estimuladas eletricamente na frequência de 0,2 Hz. Durante a estabilização (~ 90 min), as fibras foram estiradas para a obtenção da melhor relação comprimento/desenvolvimento de força (detalhes em RIVAROLI et al., 2006; ROCHA et al., 2006, 2007). A partir da estabilização, a Fc foi, então, registrada.

No primeiro protocolo, após estabilização em solução controle, as preparações ventriculares foram mantidas estimuladas a 0.2 Hz (12 bpm) ininterruptamente durante 40 min para verificar a ocorrência ou não de deterioração da força isométrica no tempo experimental determinado (**grupo Ctrl**). A partir da constatação de que o tempo experimental não influenciava os valores de Fc, as tiras ventriculares foram submetidas aos protocolos experimentais descritos abaixo.

Ao término de cada protocolo, o comprimento das tiras foi aferido com auxílio de um paquímetro e subseqüentemente foram levemente secas em papel de filtro e o peso úmido foi determinado da porção da tira cujas contrações isométricas haviam sido registradas.

#### 3.2.2.1 Efeito do ácido láctico

Após a estabilização (como citado acima), o efeito da acidose láctica na contratilidade ventricular foi estudado por meio da adição de 22 mM de ácido láctico aos banhos contendo a solução fisiológica (**grupo AL**). Os registros de desenvolvimento de tensão isométrica (Fc) e dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) foram efetuados a cada 5 min durante os 40 min experimentais.



**Figura 7.** Set experimental utilizado para a obtenção das respostas inotrópicas e cronotrópicas das tiras ventriculares de matrizã. **A:** banho para órgãos com quatro cubetas; **B:** banho termostatizado; **C:** cilindro de mistura carbogênica; **D:** estimuladores elétricos; **E:** transdutores de força isométrica, acoplados a microestiradores; **F:** amplificador de força; **G:** sistema informatizado com placa de aquisição e tratamento dos dados.

### 3.2.2.2. Papel do cálcio extracelular.

Para verificar a dependência da contratilidade ao cálcio extracelular e sua relação com o efeito do ácido láctico, após a estabilização, as tiras ventriculares foram submetidas a uma solução livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e tamponada com 1mM de EGTA (**grupo  $\emptyset\text{Ca}$** ). O EGTA (ácido etileno glycol tetra-acético) é um agente quelante com altíssima afinidade pelos íons cálcio, utilizado para tamponar o  $\text{Ca}^{2+}$  e garantir que a solução fisiológica esteja livre de cálcio. Após tal procedimento, os registros de força foram efetuados conforme descrito anteriormente. Este mesmo protocolo foi realizado com a adição de 22 mM de AL concomitante à substituição da solução controle pela solução livre de  $\text{Ca}^{2+}$  (**grupo  $\emptyset\text{CaAL}$** ).

### 3.2.2.3. Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).

Para verificar a importância do trocador NCX nos mecanismos envolvidos na contratilidade, a solução fisiológica controle foi trocada por uma solução em que houve a substituição do NaCl por 125mM de LiCl (**grupo Li**). Funcionalmente, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) é considerado cataliticamente inerte a cátions monovalentes inorgânicos, como o  $\text{Li}^+$ , que é freqüentemente utilizado em soluções livres de sódio para estudar a atividade do NCX, principalmente para reverter sua atividade (PALTY et al., 2004). Este mesmo protocolo foi realizado com a adição de 22 mM de AL concomitante à substituição da solução controle pela solução LiCl (**grupo Li-AL**).

#### 3.2.2.4. Papel do Retículo Sarcoplasmático (RS).

Para verificar a importância do RS nos mecanismos envolvidos na contratilidade, após adição do ácido láctico, os banhos experimentais receberam 10  $\mu\text{M}$  de rianodina 10 minutos antes da adição de 22 mM de AL (**grupo Ri-AL**). A rianodina foi dissolvida em água destilada na concentração adequada e então mantida congelada a  $-18^\circ\text{C}$ .

A contribuição relativa do RS como fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  para o aparato contrátil pode ser examinada utilizando-se a rianodina, um alcalóide que se liga aos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS e inibe a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ . Experimentos com células intactas demonstraram que a rianodina mantém os canais de cálcio do RS parcialmente abertos, prevenindo o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  em seu interior (BERS et al., 1987). Dessa forma, a rianodina tem sido utilizada para o teste da importância funcional do RS no acoplamento E-C.

#### 3.2.2.5. Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ (NHE).

Para verificar a importância do NHE nos mecanismos envolvidos na contratilidade, 1 mM de cloridrato de amiloride foi adicionado às cubetas experimentais 30 minutos antes da adição do ácido láctico (**grupo Am-AL**). Amiloride foi a primeira droga da família dos inibidores do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Outros inibidores mais seletivos vem sendo desenvolvidos, entre os quais: cariporide (HOE-642), eniporide (EMD-96785), e zoniporide (CP-597,396). Em modelos animais de isquemia miocárdica e reperfusão, apresentam uma marcante redução intracelular da acumulação do  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ .

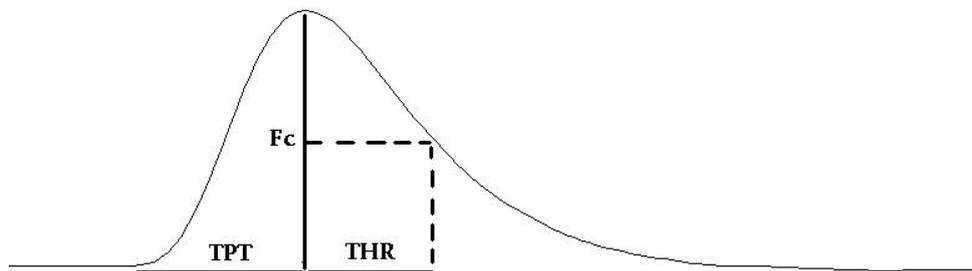
### 3.2.3. Forma de apresentação dos dados.

A força de contração ( $F_c$ ) está representada em valores absolutos ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ).

Os parâmetros tempo-dependentes foram analisados e expressos como se segue:

- Tempo para o pico de força (TPT - *time to peak tension*): representado em valores absolutos (ms) .
- Tempo para 50% do Relaxamento (THR - *time to half relaxation*): expresso da mesma forma que a descrita para TPT, ou seja, em valores absolutos (ms).

A representação de um registro de força de contração com as medidas dos parâmetros descritos acima é mostrada na figura 8.



**Figura 8.** Esquema mostrando as variáveis medidas no registro de força de contração isométrica no presente estudo.  $F_c$ : Força de contração; TPT: Tempo para que o pico máximo de força seja atingido; THR: Tempo necessário para que ocorra 50% do relaxamento.

### 3.2.4. Tratamento estatístico dos dados.

Os valores estão apresentados como  $\text{media} \pm \text{E.P.M.}$  Foram consideradas diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância. Os seguintes testes estatísticos foram adotados no presente estudo (GraphPad Instat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA):

- O teste-t ou de Mann-Whitney (dependendo dos critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade) foi realizado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre pontos correspondentes de diferentes grupos experimentais;
- A Análise de variância (ANOVA) one-way, complementada pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para a identificação das diferenças significativas entre os valores de um mesmo grupo experimental ao longo do tempo.

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Efeito do tempo de exposição e os efeitos da acidose láctica.

Os valores médios da força de contração ( $F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, estimuladas a 0,2 Hz, ao longo do tempo de experimental (40 min), nos grupos controle (Ctrl -  $n=10$ ) e exposto ao ácido láctico (AL -  $n=10$ ) são apresentados na tabela 1 e representados graficamente na figura 9. Os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) são apresentados nas tabelas 2 e 3 e representados graficamente nas figuras 10 e 11.

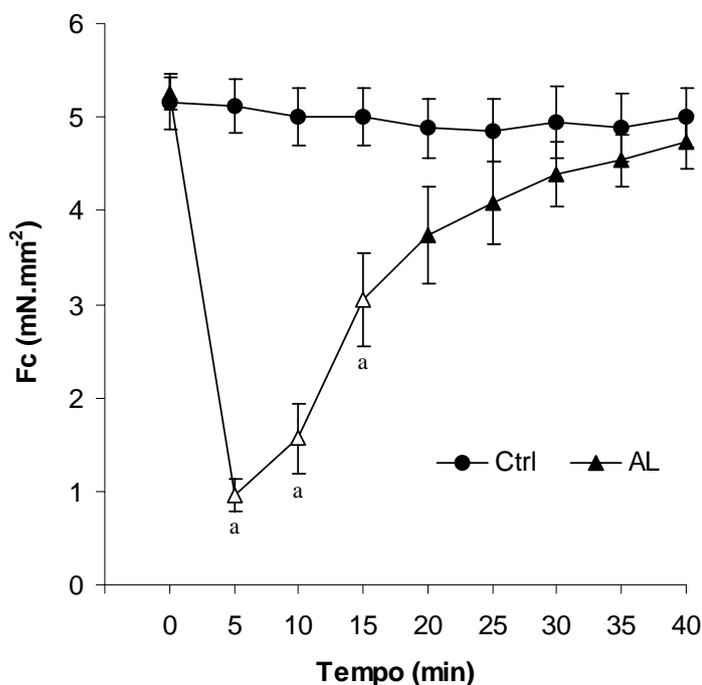
O grupo Ctrl manteve a  $F_c$  e os parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) constantes ao longo dos 40 min experimentais. O grupo AL exibiu curva inotrópica bifásica em resposta à adição de 22 mM de ácido láctico ao banho. Houve uma redução significativa da  $F_c$  no 5º min (de  $5,3 \pm 0,2$  para  $1,0 \pm 0,2 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) e, nos minutos subsequentes, recuperação dos valores iniciais após 20 min ( $3,7 \pm 0,5 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) de exposição à solução ácida, atingindo o valor de  $4,7 \pm 0,3 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$  no 40º min (figura 9). Neste grupo, não foram registradas alterações significativas no TPT ao longo dos 40 min experimentais enquanto o THR aumentou significativamente a partir do 10º min (de  $264,3 \pm 20,4$  para  $322,0 \pm 27,5 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) e se manteve mais elevado que o valor inicial ao longo do tempo experimental.

Os valores médios da razão entre o tempo para o pico de força e a força de contração ( $\text{TPT}/F_c - \text{ms} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) dos grupos Ctrl e AL são apresentados na tabela 4 e representados graficamente na figura 12. Este parâmetro manteve-se constante no grupo Ctrl durante todo o tempo experimental. Já no grupo AL, o valor inicial desta razão ( $78,8 \pm 7,5 \text{ ms} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) apresentou aumento significativo do 5º ao 15º min ( $615,5 \pm 66,1$  e  $201,3 \pm 68,4 \text{ ms} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ , respectivamente), diferente do observado para os valores absolutos de TPT.

Os valores médios da razão entre tempo para 50% de relaxamento e a força de contração ( $\text{THR}/F_c - \text{ms} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) dos grupos Ctrl e AL são apresentados na tabela 5 e representados graficamente na figura 13. No grupo Ctrl tal razão manteve-se constante enquanto no grupo AL aumentou significativo do 5º ao 20º min ( $359,0 \pm 38,3$  e  $116,3 \pm 25,2 \text{ ms} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ , respectivamente) em relação ao valor inicial ( $50,5 \pm 3,8 \text{ ms} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ), diferente do observado para os valores absolutos de THR, que mostram um aumento sustentado a partir do 10º min.

**Tabela 1.** Valores médios de força de contração isométrica ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL -  $n = 10$ ), após substituição do NaCl por LiCl (grupo Li -  $n = 10$ ) e após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (grupo Li-AL -  $n = 10$ ). Médias  $\pm$  E.P. a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo Li. ( $P < 0,05$ ).

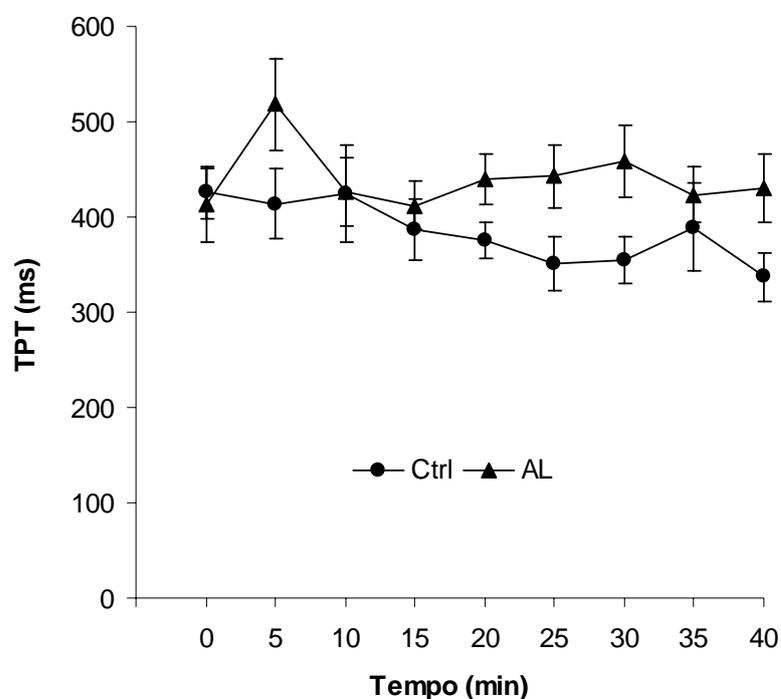
Tempo (min)	$F_c$ ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )			
	Ctrl	AL	Li	Li-AL
0	5,2 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 0,1
5	5,1 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,2	5,8 $\pm$ 0,4 b	2,1 $\pm$ 0,4 a,b,c
10	5,0 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,4 a	6,7 $\pm$ 0,5 a,b	3,6 $\pm$ 0,4 a,b,c
15	5,0 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,5 a	6,8 $\pm$ 0,5 a,b	5,0 $\pm$ 0,5 b,c
20	4,9 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 0,5 a	6,5 $\pm$ 0,4 a,b	5,9 $\pm$ 0,4 b
25	4,9 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,4 b	6,1 $\pm$ 0,4 b
30	4,9 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 0,4 b	6,0 $\pm$ 0,4 b
35	4,9 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 0,3 b
40	5,0 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 0,3 b



**Figura 9.** Força de contração isométrica ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl) e após adição de ácido láctico (AL). Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl. ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Valores médios do tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl - n = 10), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL - n = 10), após substituição do NaCl por LiCl (grupo Li - n = 10) e após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (grupo Li-AL - n = 10). Médias  $\pm$  E.P.

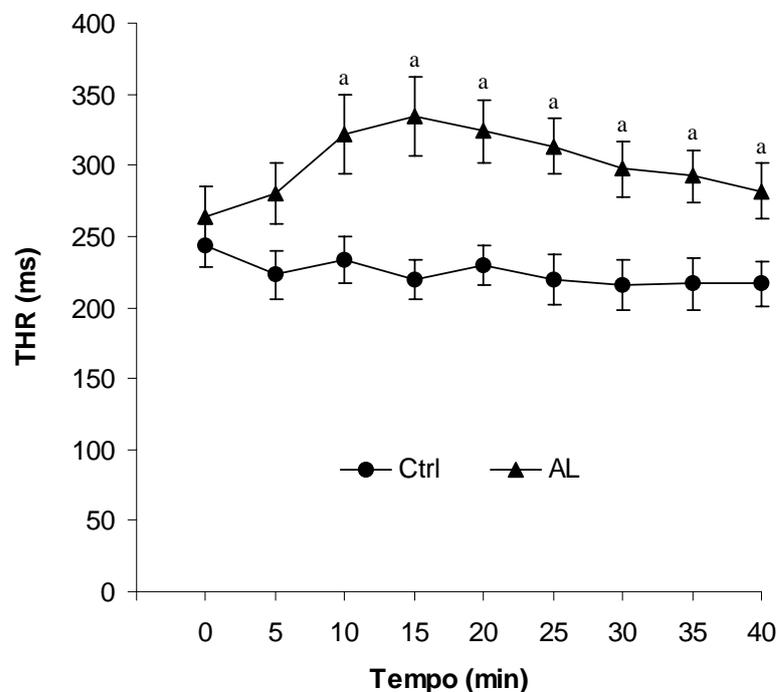
Tempo (min)	TPT (ms)			
	Ctrl	AL	Li	Li-AL
0	413,0 $\pm$ 22,4	400,5 $\pm$ 35,2	364,0 $\pm$ 19,1	346,5 $\pm$ 27,4
5	439,0 $\pm$ 28,7	531,0 $\pm$ 43,7	371,0 $\pm$ 14,7	434,0 $\pm$ 25,4
10	412,0 $\pm$ 29,6	426,0 $\pm$ 36,3	392,0 $\pm$ 10,6	430,5 $\pm$ 20,5
15	398,5 $\pm$ 28,9	412,3 $\pm$ 24,7	378,0 $\pm$ 10,6	451,5 $\pm$ 23,3
20	388,0 $\pm$ 14,4	440,0 $\pm$ 26,9	388,5 $\pm$ 17,1	427,0 $\pm$ 16,5
25	376,0 $\pm$ 22,6	430,0 $\pm$ 23,5	390,3 $\pm$ 19,9	430,5 $\pm$ 19,0
30	379,5 $\pm$ 19,7	445,8 $\pm$ 29,4	392,0 $\pm$ 21,8	413,0 $\pm$ 13,7
35	402,0 $\pm$ 19,8	411,0 $\pm$ 18,7	390,3 $\pm$ 17,6	399,0 $\pm$ 8,8
40	374,5 $\pm$ 15,4	401,3 $\pm$ 12,2	390,3 $\pm$ 17,6	388,5 $\pm$ 11,1



**Figura 10.** Tempo para que o pico de tensão seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl) e após adição de ácido láctico (AL). Médias  $\pm$  E.P.

**Tabela 3.** Valores médios do tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl – n = 10), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL – n = 10), após substituição do NaCl por LiCl (grupo Li – n = 10) e após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (grupo Li-AL – n = 10). Médias  $\pm$  E.P. a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. (P < 0,05).

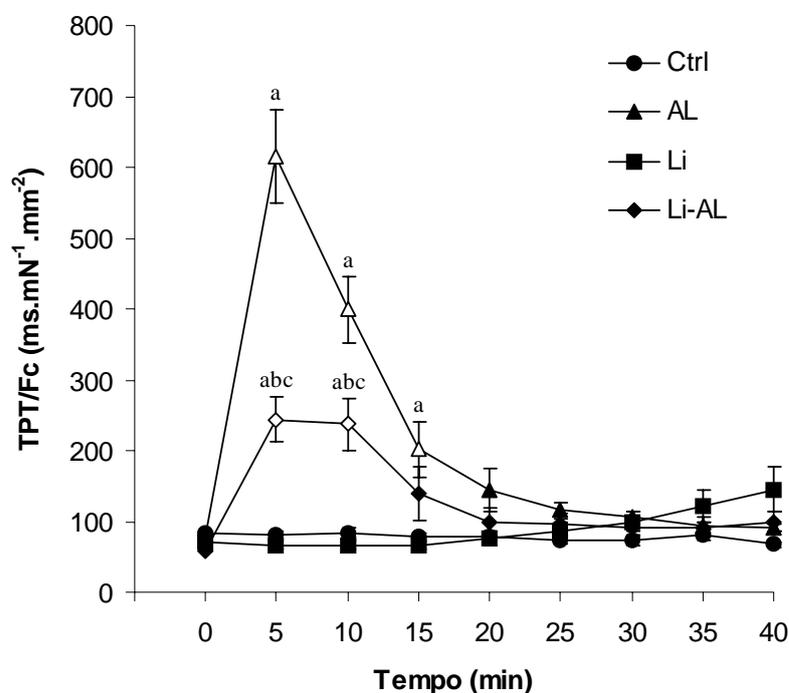
Tempo (min)	THR (ms)			
	Ctrl	AL	Li	Li-AL
0	243,5 $\pm$ 15,6	264,3 $\pm$ 20,4	262,5 $\pm$ 9,1	238,0 $\pm$ 14,0
5	223,0 $\pm$ 16,8	280,0 $\pm$ 21,2	276,5 $\pm$ 16,3 a	280,0 $\pm$ 15,9
10	233,0 $\pm$ 16,5	322,0 $\pm$ 27,5 a	308,0 $\pm$ 18,3 a	266,0 $\pm$ 19,8
15	219,5 $\pm$ 13,4	334,3 $\pm$ 27,3 a	332,5 $\pm$ 21,5 a	294,0 $\pm$ 17,5 a
20	230,0 $\pm$ 13,9	323,8 $\pm$ 22,4 a	346,5 $\pm$ 26,9 a	318,5 $\pm$ 10,5 a
25	219,5 $\pm$ 17,1	313,3 $\pm$ 19,8 a	365,8 $\pm$ 20,6 a	336,0 $\pm$ 15,9 a
30	216,0 $\pm$ 17,3	297,5 $\pm$ 19,8 a	364,0 $\pm$ 19,1 a	357,0 $\pm$ 19,6 a
35	216,5 $\pm$ 18,2	292,3 $\pm$ 17,8 a	353,5 $\pm$ 24,2 a	371,0 $\pm$ 24,7 ab
40	216,5 $\pm$ 15,8	281,8 $\pm$ 19,5 a	350,0 $\pm$ 15,9 a	367,5 $\pm$ 26,2 ab



**Figura 11.** Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl) e após adição de ácido láctico (AL). Médias  $\pm$  E.P. a: diferença em relação ao grupo Ctrl. (P < 0,05).

**Tabela 4.** Valores médios da razão entre tempo para o pico de força e força de contração (TPT/Fc -  $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) das tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl - n = 10), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL - n = 10), após substituição do NaCl por LiCl (grupo Li - n = 10) e após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (grupo Li-AL - n = 10). Médias  $\pm$  E.P. a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo Li. (P < 0,05).

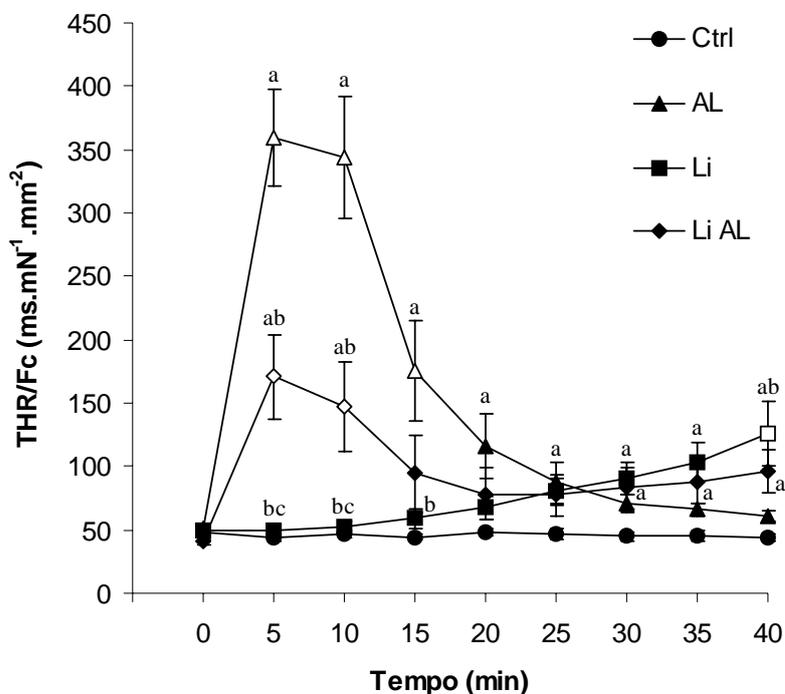
Tempo (min)	TPT/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ )			
	Ctrl	AL	Li	Li-AL
0	82,9 $\pm$ 4,3	78,8 $\pm$ 7,5	70,5 $\pm$ 6,9	59,2 $\pm$ 2,1
5	80,9 $\pm$ 5,7	615,5 $\pm$ 66,1 a	66,7 $\pm$ 5,7	244,0 $\pm$ 61,4 abc
10	83,8 $\pm$ 6,5	399,1 $\pm$ 87,2 a	66,6 $\pm$ 5,8	236,8 $\pm$ 87,5 abc
15	77,5 $\pm$ 5,6	201,3 $\pm$ 68,4 a	67,0 $\pm$ 7,4	139,2 $\pm$ 41,6
20	79,2 $\pm$ 6,6	144,6 $\pm$ 30,6	76,2 $\pm$ 10,3	98,2 $\pm$ 20,7
25	73,2 $\pm$ 5,4	116,0 $\pm$ 11,5	87,2 $\pm$ 11,7	96,3 $\pm$ 16,1
30	74,0 $\pm$ 7,1	106,2 $\pm$ 7,3	100,0 $\pm$ 15,1	90,9 $\pm$ 11,6
35	80,0 $\pm$ 7,8	94,2 $\pm$ 4,9	120,8 $\pm$ 23,0	92,1 $\pm$ 14,0
40	67,7 $\pm$ 3,2	91,4 $\pm$ 5,1	144,5 $\pm$ 31,7	99,6 $\pm$ 14,1



**Figura 12.** Razão entre tempo para o pico de força e força de contração (TPT/Fc -  $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) das tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após substituição do NaCl por LiCl e adição de ácido láctico (Li-AL). Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais. (P < 0,05). a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo Li. (P < 0,05)

**Tabela 5** Valores médios da razão entre tempo para 50% de relaxamento e força de contração (THR/Fc -  $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) das tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl - n = 10), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL - n = 10), após substituição do NaCl por LiCl (grupo Li - n = 10) e após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (grupo Li-AL - n = 10). Médias  $\pm$  E.P. a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo Li. (P < 0,05).

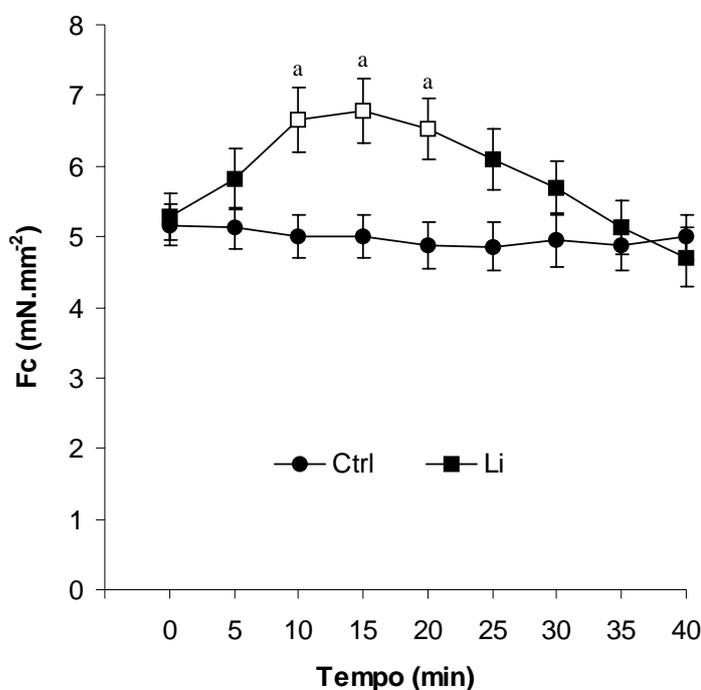
Tempo (min)	THR/Fc ( $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ )			
	Ctrl	AL	Li	Li-AL
0	47,7 $\pm$ 2,9	50,5 $\pm$ 3,8	50,2 $\pm$ 3,0	40,4 $\pm$ 1,9
5	44,0 $\pm$ 3,2	359,0 $\pm$ 38,3 a	49,5 $\pm$ 4,3 bc	170,7 $\pm$ 32,8 ab
10	46,8 $\pm$ 2,4	343,5 $\pm$ 48,2 a	52,1 $\pm$ 5,0 bc	147,2 $\pm$ 35,7 ab
15	44,3 $\pm$ 2,1	175,3 $\pm$ 39,4 a	58,9 $\pm$ 7,4 b	94,7 $\pm$ 30,5
20	47,8 $\pm$ 2,7	116,3 $\pm$ 25,2 a	67,4 $\pm$ 9,7	78,3 $\pm$ 20,8
25	46,3 $\pm$ 4,0	87,6 $\pm$ 16,3	80,2 $\pm$ 10,7 a	77,4 $\pm$ 15,9
30	44,8 $\pm$ 4,0	70,5 $\pm$ 6,8	90,9 $\pm$ 13,0 a	82,9 $\pm$ 16,8 a
35	45,6 $\pm$ 4,3	65,8 $\pm$ 5,0	103,1 $\pm$ 16,1 a	87,5 $\pm$ 16,8 a
40	44,0 $\pm$ 3,1	60,6 $\pm$ 4,5	125,4 $\pm$ 25,4 ab	96,3 $\pm$ 17,1 a



**Figura 13.** Razão entre tempo para 50% de relaxamento e força de contração (THR/Fc -  $\text{ms.mN}^{-1}.\text{mm}^2$ ) das tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após substituição do NaCl por LiCl e adição de ácido láctico (Li-AL). Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo Li. (P < 0,05).

#### 4.2. Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).

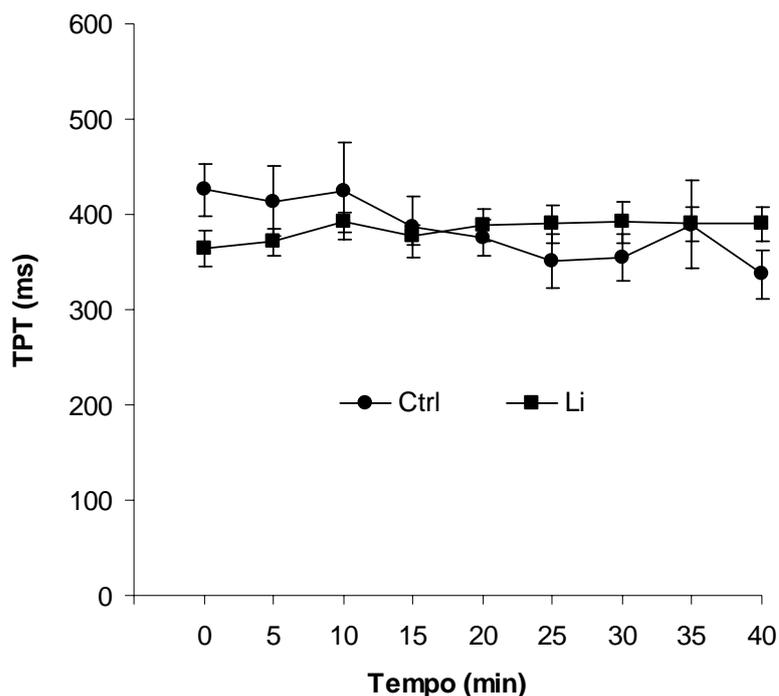
Os valores médios da Fc ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, estimulados a 0,2 Hz, ao longo do tempo de experimental (40 min), nos grupos controle (Ctrl - n=10), após substituição do NaCl por LiCl (Li - n = 10) e após adição de ácido láctico (Li-AL - n = 10) são apresentados na tabela 1 e representados graficamente nas figura 14 e 15. A substituição de NaCl por LiCl (grupo Li) causou aumento dos valores iniciais de Fc ( $5,3 \pm 0,3 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) do 10º ( $6,7 \pm 0,5 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) até o 20º min ( $6,5 \pm 0,4 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ). Já a combinação de LiCl com ácido láctico (grupo Li-AL) fez com que a Fc se comportasse de forma similar à registrada para o grupo AL, ou seja, redução no 5º min (de  $5,5 \pm 0,1$  para  $2,1 \pm 0,4 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), apesar da Fc de Li-AL ser significativamente superior a do grupo AL ao longo dos 40 min experimentais. Além disso, no grupo Li-AL a recuperação dos valores iniciais ocorreu mais rapidamente, já no 15º min ( $5,0 \pm 0,5 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ).



**Figura 14.** Força de contração isométrica (Fc -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl) e após substituição de NaCl por LiCl (Li). Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl. ( $P < 0,05$ ).

Os valores médios de TPT e THR (ms) dos grupos controle (Ctrl - n=10), após substituição do NaCl por LiCl (Li - n = 10) e após adição de ácido láctico (Li-AL - n = 10) são apresentados nas tabelas 2 e 3 e representados graficamente nas figuras 16 ,17, 18 e 19. Os valores médios da razão TPT/Fc ( $\text{ms} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^2$ ) dos grupos Li (n=10) e Li-AL (n=10) são apresentados na tabela 4 e representados graficamente na figura 12 e os valores médios da razão THR/Fc ( $\text{ms} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^2$ ) são apresentados na tabela 5 e representados graficamente na figura 13.

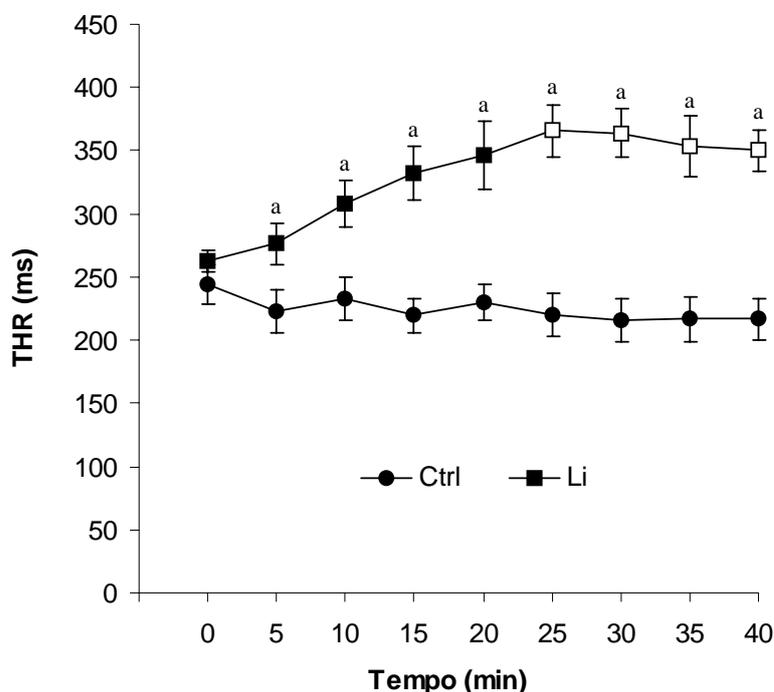
A substituição de NaCl por LiCl não alterou os valores do TPT nem da razão TPT/Fc no grupo Li, mas alterou os valores do TPT (5<sup>o</sup> ao 25<sup>o</sup> min) e da razão TPT/Fc (5<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> min) quando combinado ao ácido láctico (grupo Li-AL) (figura 12).



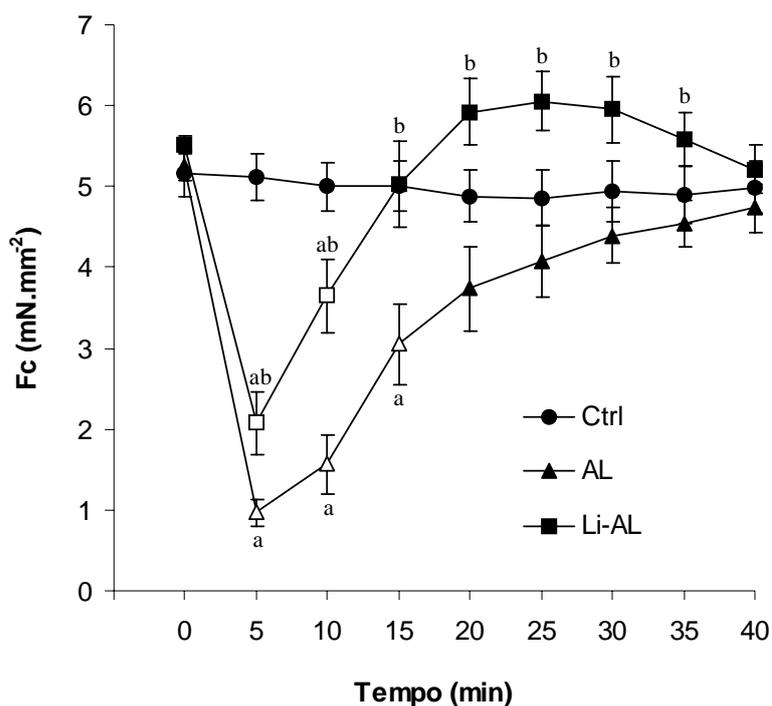
**Figura 15.** Tempo para que o pico de tensão seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl) e após substituição do NaCl por LiCl (Li). Médias  $\pm$  E.P.

Apesar da tendência de aumento, os valores de THR do grupo Li só foram significativamente superiores aos iniciais a partir do 25º min (de  $262,5 \pm 9,1$  para  $365,8 \pm 20,6$  ms), porém, significativamente superiores aos do grupo Ctrl do 5º min ao 40º min. No grupo Li-AL, o THR também aumentou significativamente no 25º min (de  $238,0 \pm 14,0$  ms para  $336,0 \pm 15,9$  ms), chegando a  $367,5 \pm 26,2$  ms no 40º min. Tais valores foram significativamente superiores aos obtidos para Ctrl a partir do 15º min e aos obtidos para AL a partir do 35º min.

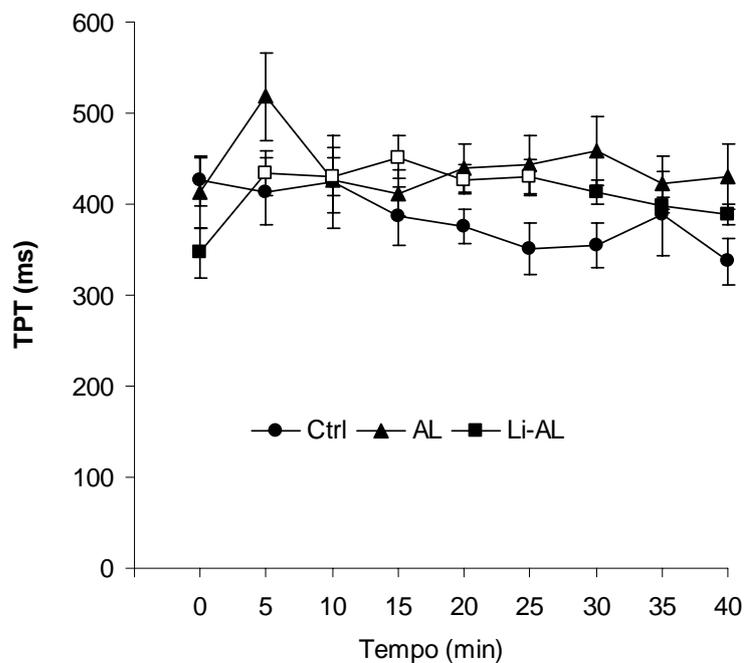
A razão THR/Fc (figura 13) do grupo Li foi mantida semelhante a apresentada por Ctrl até o 20º min, a partir do qual aumentou progressiva e significativamente. No grupo Li-AL, esta razão aumentou significativamente em relação aos valores iniciais no 5º e 10º min, similar ao observado no grupo AL. Porém, os valores de THR/Fc do grupo Li-AL foram significativamente inferiores aos apresentados por AL no intervalo compreendido entre o 5º e o 15º min.



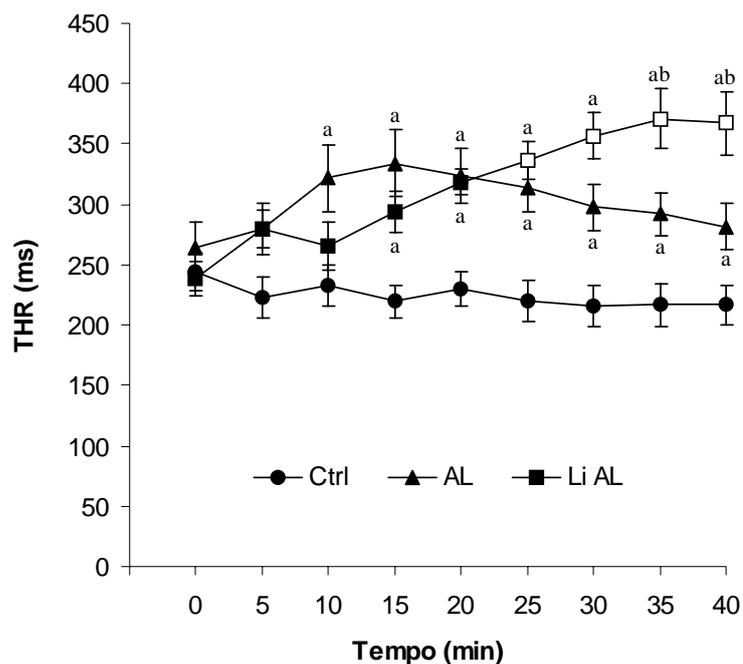
**Figura 16.** Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl) e após substituição do NaCl por LiCl (Li). Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl. ( $P < 0,05$ ).



**Figura 17.** Força de contração isométrica ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após substituição do NaCl por LiCl e adição de ácido láctico (Li-AL). Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença significativa em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. ( $P < 0,05$ ).



**Figura 18.** Tempo para que o pico de tensão seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após substituição do NaCl por LiCl e adição de ácido láctico (Li-AL). Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais. ( $P < 0,05$ ).



**Figura 19.** Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido lático (AL) e após substituição do NaCl por LiCl e adição de ácido lático (Li-AL). Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3. Papel do cálcio extracelular.

Os valores médios da força de contração ( $F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, estimulados a 0,2 Hz, ao longo do tempo de experimental (40 min), em condições controle (Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de ácido lático (AL -  $n = 10$ ), após remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ( $\emptyset\text{Ca} - n = 10$ ) e após remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e adição de ácido lático ( $\emptyset\text{CaAL} - n = 10$ ) são apresentados na tabela 6 e representados na figura 20.

A remoção do cálcio extracelular (grupo  $\emptyset\text{Ca}$ ) resultou na redução da  $F_c$  inicial de  $4,8 \pm 0,4 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$  para  $2,2 \pm 0,4 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$  no 5º min, redução esta que se manteve ao longo do tempo experimental, atingindo  $0,2 \pm 0,1 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$  no 40º min.

A adição do ácido lático produziu uma redução da  $F_c$  mais acentuada no grupo  $\emptyset\text{CaAL}$  do que no grupo  $\emptyset\text{Ca}$  nos primeiros 15 min de exposição. A  $F_c$  inicial, de  $4,6 \pm 0,1 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ , caiu para  $0,5 \pm 0,1 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$  no 5º min. Adicionalmente, as preparações deste grupo só foram capazes de se contrair de forma regular até o 30º min. experimental (figura 20)

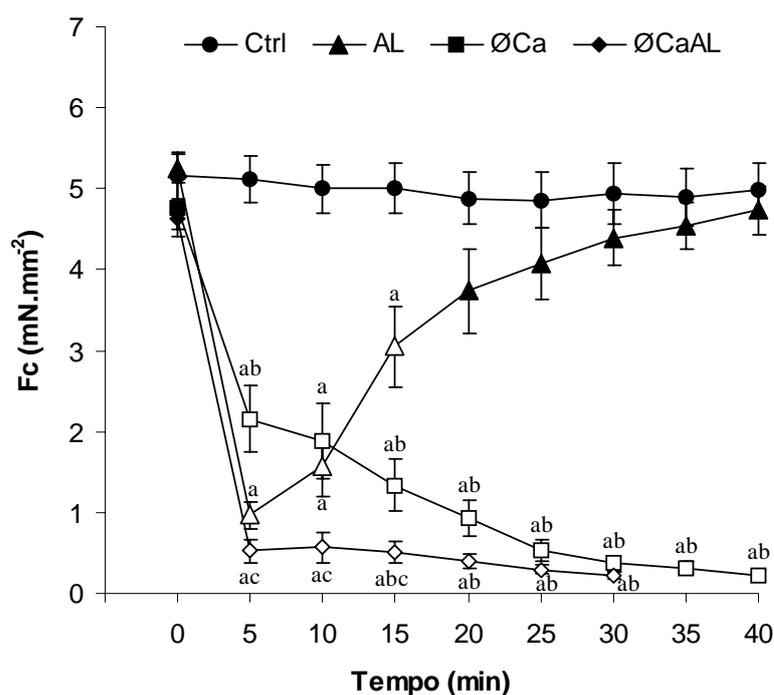
Os valores médios de TPT e THR (ms) são apresentados nas tabelas 7 e 8 e representados graficamente nas figuras 21 e 22.

Os grupos Ctrl, AL, ØCa e ØCaAL não apresentaram diferença significativa nos valores de TPT ao longo do tempo entre si (figura 21).

Os valores de THR do grupo ØCa não diferiram dos obtidos para o grupo Ctrl. Já o THR do grupo ØCaAL foram superiores aos de Ctrl no intervalo de tempo compreendido entre 5 e 30 min e superiores aos apresentados por ØCa no 25<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> min, mas não foram detectadas diferenças em relação ao THR de AL (figura 22).

**Tabela 6.** Valores médios de força de contração isométrica (Fc - mN.mm<sup>-2</sup>) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl - n = 10), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL - n = 10), após remoção do cálcio (grupo ØCa - n = 10) e após remoção do cálcio e adição de 22 mM de ácido láctico (grupo ØCaAL - n = 10). Médias ± E.P. a: diferença significativa em relação ao grupo Ctrl; b: diferença significativa em relação ao grupo AL; c: diferença significativa em relação ao grupo ØCa. (P < 0,05).

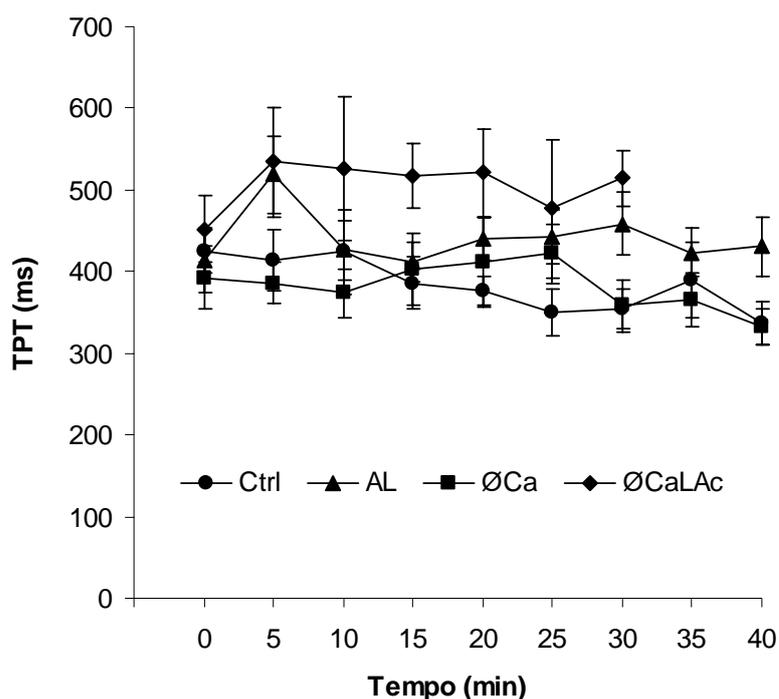
Tempo (min)	(Fc (mN.mm <sup>-2</sup> ))			
	Ctrl	AL	ØCa	ØCaAL
0	5,2 ± 0,3	5,3 ± 0,2	4,8 ± 0,4	4,6 ± 0,1
5	5,1 ± 0,3	1,0 ± 0,2 a	2,2 ± 0,4 ab	0,5 ± 0,1 ac
10	5,0 ± 0,3	1,6 ± 0,4 a	1,9 ± 0,5 a	0,6 ± 0,2 ac
15	5,0 ± 0,3	3,0 ± 0,5 a	1,3 ± 0,3 ab	0,5 ± 0,1 abc
20	4,9 ± 0,3	3,7 ± 0,5	0,9 ± 0,2 ab	0,4 ± 0,1 ab
25	4,9 ± 0,3	4,1 ± 0,4	0,5 ± 0,1 ab	0,3 ± 0,1 ab
30	4,9 ± 0,4	4,4 ± 0,3	0,4 ± 0,1 ab	0,2 ± 0,0 ab
35	4,9 ± 0,4	4,5 ± 0,3	0,3 ± 0,1 ab	-
40	5,0 ± 0,3	4,7 ± 0,3	0,2 ± 0,1 ab	-



**Figura 20.** Força de contração isométrica ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL), após remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ( $\text{ØCa}$ ) e após remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e adição de ácido láctico ( $\text{ØCaAL}$ ). Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo  $\text{ØCa}$ . ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 7.** Valores médios do tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL -  $n = 10$ ), após remoção do cálcio (grupo  $\text{ØCa}$  -  $n = 10$ ) e após remoção do cálcio e adição de 22 mM de ácido láctico (grupo  $\text{ØCaAL}$  -  $n = 10$ ). Médias  $\pm$  E.P.

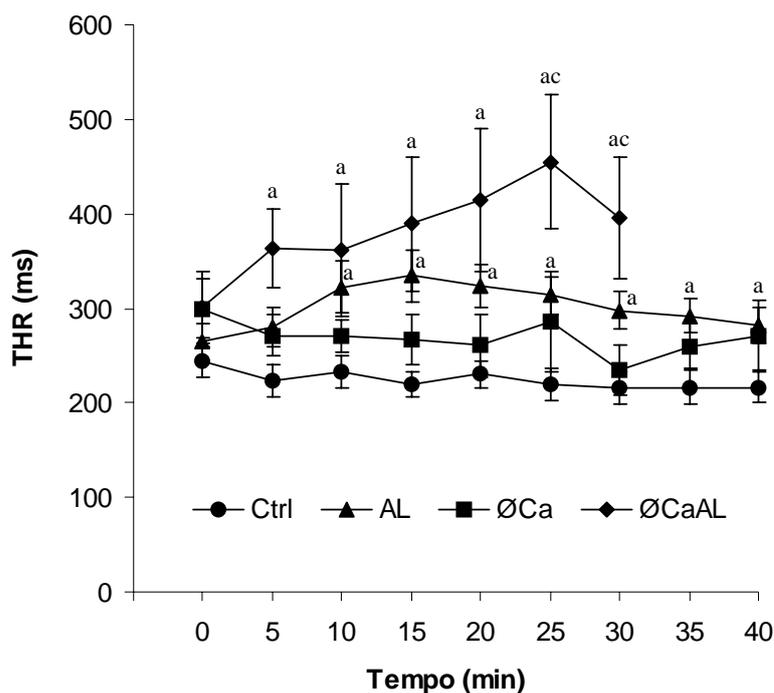
Tempo (min)	TPT (ms)			
	Ctrl	AL	ØCa	ØCaLAc
0	425,5 $\pm$ 26,9	413,0 $\pm$ 38,8	392,6 $\pm$ 38,7	451,3 $\pm$ 40,7
5	414,0 $\pm$ 37,2	518,5 $\pm$ 47,8	385,6 $\pm$ 25,4	534,0 $\pm$ 67,9
10	424,5 $\pm$ 51,6	426,0 $\pm$ 36,3	373,3 $\pm$ 29,3	526,0 $\pm$ 87,8
15	386,0 $\pm$ 32,1	412,3 $\pm$ 24,7	402,4 $\pm$ 44,5	517,0 $\pm$ 39,9
20	375,5 $\pm$ 19,1	440,0 $\pm$ 26,9	412,6 $\pm$ 54,4	521,0 $\pm$ 54,2
25	351,0 $\pm$ 28,7	442,5 $\pm$ 33,4	421,7 $\pm$ 36,8	477,3 $\pm$ 84,5
30	354,5 $\pm$ 24,9	458,3 $\pm$ 38,3	357,7 $\pm$ 31,1	514,7 $\pm$ 34,5
35	389,5 $\pm$ 45,6	423,5 $\pm$ 29,7	365,7 $\pm$ 33,7	
40	337,0 $\pm$ 26,2	430,5 $\pm$ 35,5	332,6 $\pm$ 22,8	



**Figura 21.** Tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) por tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL), após remoção do cálcio (ØCa) e após remoção do cálcio e adição de ácido láctico (ØCaAL). Médias  $\pm$  E.P.

**Tabela 8.** Valores médios do tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl - n = 10), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL - n = 10), após remoção do cálcio (grupo ØCa - n = 10) e após remoção do cálcio e adição de 22 mM de ácido láctico (grupo ØCaAL - n = 10). Médias  $\pm$  E.P. a: diferença significativa em relação ao grupo Ctrl; b: diferença significativa em relação ao grupo AL; c: diferença significativa em relação ao grupo ØCa. (P < 0,05).

Tempo (min)	THR (ms)			
	Ctrl	AL	ØCa	ØCaAL
0	243,5 $\pm$ 15,6	264,3 $\pm$ 20,4	299,9 $\pm$ 31,5	300,2 $\pm$ 37,9
5	223,0 $\pm$ 16,8	280,0 $\pm$ 21,2	271,4 $\pm$ 22,0	363,8 $\pm$ 41,6 a
10	233,0 $\pm$ 16,5	322,0 $\pm$ 27,5 a	270,9 $\pm$ 17,7	362,0 $\pm$ 70,4 a
15	219,5 $\pm$ 13,4	334,3 $\pm$ 27,3 a	266,7 $\pm$ 26,2	389,3 $\pm$ 70,5 a
20	230,0 $\pm$ 13,9	323,8 $\pm$ 22,4 a	260,6 $\pm$ 32,7	414,7 $\pm$ 75,3 a
25	219,5 $\pm$ 17,1	313,3 $\pm$ 19,8 a	285,1 $\pm$ 53,2	454,6 $\pm$ 71,1 ac
30	216,0 $\pm$ 17,3	297,5 $\pm$ 19,8 a	235,4 $\pm$ 26,5	395,2 $\pm$ 64,4 ac
35	216,5 $\pm$ 18,2	292,3 $\pm$ 17,8 a	260,0 $\pm$ 23,5	-
40	216,5 $\pm$ 15,8	281,8 $\pm$ 19,5 a	271,4 $\pm$ 36,3	-



**Figura 22.** Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL), após remoção do cálcio (ØCa) e após remoção do cálcio e adição de ácido láctico (ØCaAL). a: diferença significativa em relação ao grupo Ctrl; b: diferença significativa em relação ao grupo AL; c: diferença significativa em relação ao grupo ØCa Médias  $\pm$  E.P.

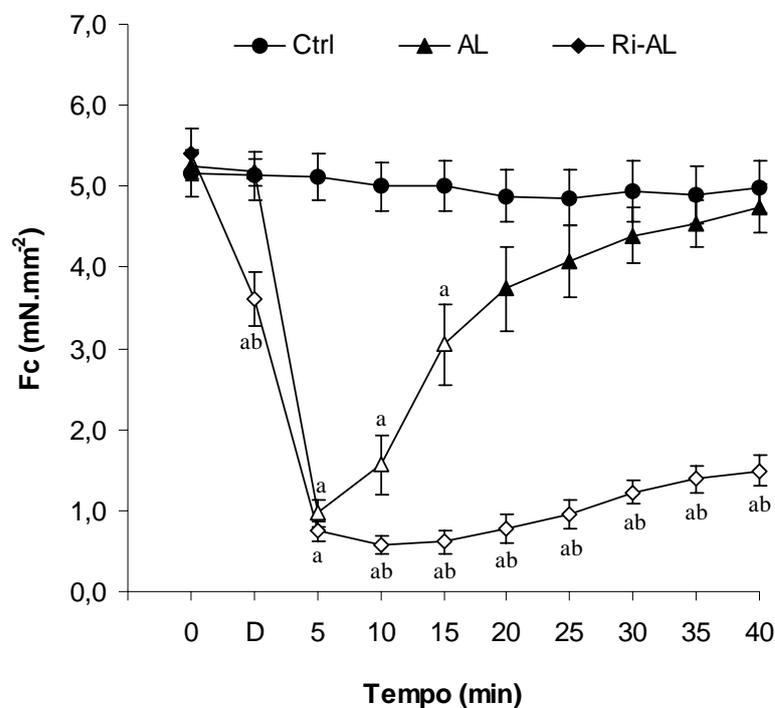
#### 4.4. Papel do Retículo Sarcoplasmático.

Os valores médios da força de contração ( $F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, estimulados a 0,2 Hz, ao longo do tempo de experimental (40 min), nos grupos controle (Ctrl - n=10), ácido láctico (AL - n=10), e ácido láctico com rianodina (Ri-AL - n=10) são apresentados na tabela 9 e representados graficamente na figura 23.

No grupo Ri-AL, a  $F_c$  inicial ( $5,4 \pm 0,3 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) reduziu-se para  $3,6 \pm 0,3 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$  após exposição ao alcalóide rianodina por 10 min. Após adição de ácido láctico, a  $F_c$  de Ri-AL foi significativamente inferior à obtida para o grupo AL a partir do 10º min ( $0,7 \pm 0,1$  e  $0,9 \pm 0,2 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ , respectivamente), mantendo-se desta forma até o final dos 40º min. experimental ( $1,5 \pm 0,2 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ).

**Tabela 9.** Valores médios de força de contração isométrica ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de 22 mM de ácido láctico (AL -  $n = 10$ ), após substituição do NaCl por LiCl com adição de 22 mM de ácido láctico (Li-AL -  $n = 10$ ), após adição de 1 mM de amiloride e 22 mM de ácido láctico (Am-AL -  $n = 10$ ) e após adição de 10  $\mu\text{M}$  de rianodina e 22 mM de ácido láctico (Ri-AL -  $n = 10$ ). Médias  $\pm$  E.P. **D** corresponde à  $F_c$  registrada após adição de amiloride ou rianodina. a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL; c: diferença em relação ao grupo Li-AL; d: diferença em relação ao grupo Am-AL. ( $P < 0,05$ ).

Tempo (min)	$F_c$ ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ )				
	Ctrl	AL	Li-AL	Am-AL	Ri-AL
0	5,3 $\pm$ 0,3	5,4 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,1	5,2 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,3
<b>D</b>	5,2 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,1 b	4,6 $\pm$ 0,2 b	3,6 $\pm$ 0,3 abcd
5	5,2 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2 a	2,1 $\pm$ 0,4 ab	0,9 $\pm$ 0,1 a	0,7 $\pm$ 0,1 ac
10	5,1 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,3 a	3,6 $\pm$ 0,4 ab	1,2 $\pm$ 0,2 a	0,6 $\pm$ 0,1 abcd
15	5,1 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,5 a	5,0 $\pm$ 0,5 b	1,5 $\pm$ 0,3 ab	0,6 $\pm$ 0,1 abcd
20	5,0 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,4 b	2,0 $\pm$ 0,3 ab	0,8 $\pm$ 0,2 abcd
25	4,9 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,4 b	2,3 $\pm$ 0,2 ab	1,0 $\pm$ 0,2 abcd
30	5,1 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 0,4	6,0 $\pm$ 0,4 b	2,6 $\pm$ 0,2 ab	1,2 $\pm$ 0,2 abcd
35	5,0 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,3	5,6 $\pm$ 0,3 b	2,7 $\pm$ 0,2 ab	1,4 $\pm$ 0,2 abcd
40	5,2 $\pm$ 0,3	4,6 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,2 ab	1,5 $\pm$ 0,2 abcd



**Figura 23.** Força de contração isométrica ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após adição de rianodina e ácido láctico (Ri-AL). D:  $F_c$  registrada após adição de rianodina. Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. ( $P < 0,05$ ).

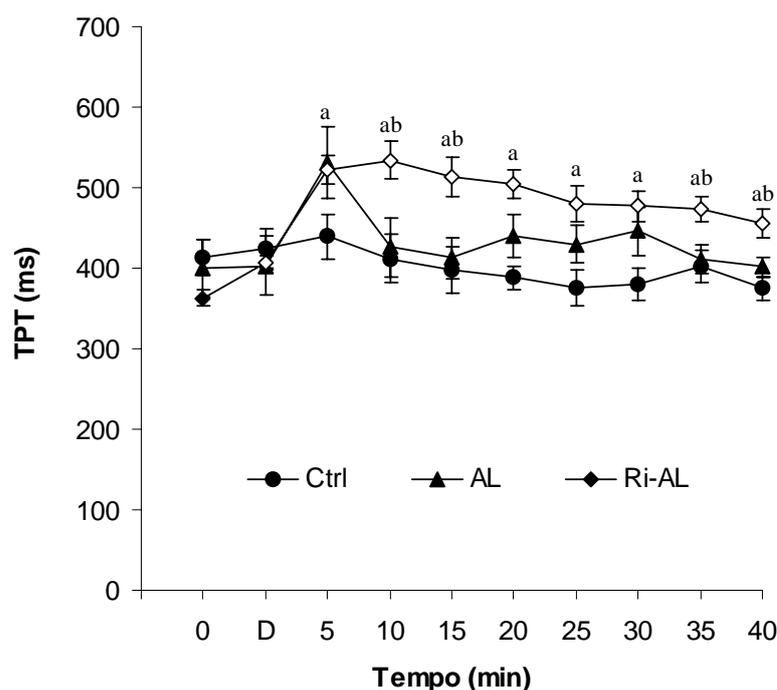
Os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) são apresentados nas tabelas 10 e 11 e representados graficamente nas figuras 24 e 25.

A adição de rianodina aumentou significativamente o TPT de Ri-AL, de  $363,1 \pm 10,0$  para  $407,4 \pm 7,5$  ms, o mesmo acontecendo após a adição de ácido láctico ( $522,3 \pm 17,1$  ms), mantendo-se neste novo patamar até o 40º minuto. Estes valores foram mais elevados que os do grupo Ctrl do 5º ao 40º min. e que os do grupo AL no 10º, 15º, 35º e 40º min.

O valor inicial de THR não foi significativamente alterado durante a adição de rianodina e de ácido láctico ( $P > 0,05$ ). Entretanto, tais valores foram significativamente superiores aos de Ctrl após adição de rianodina e do 10º até o 40º minutos experimentais.

**Tabela 10.** Valores médios do tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) de tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl – n = 10), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL – n = 10), após adição de 1 mM de amiloride e 22 mM de ácido láctico (grupo Am-AL – n = 10) e após adição de 10 µM de rianodina e 22 mM de ácido láctico (grupo Ri-AL – n = 10). Médias  $\pm$  E.P. **D** corresponde à Fc registrada após adição de amiloride ou rianodina. a: diferença significativa em relação ao grupo Ctrl; b: diferença significativa em relação ao grupo AL; c: diferença significativa em relação ao grupo Ri-AL. ( $P < 0,05$ ).

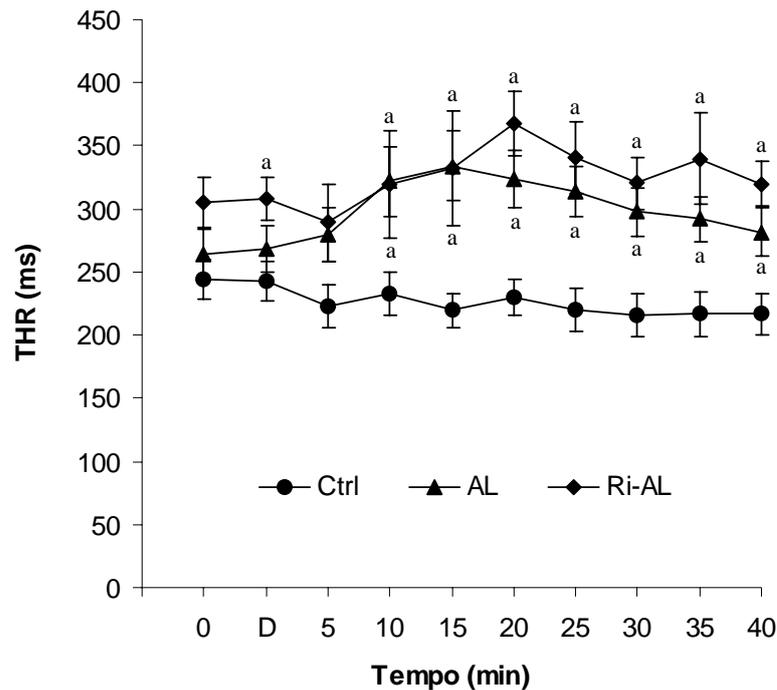
Tempo (min)	TPT (ms)			
	Ctrl	AL	Ri-AL	Am-AL
0	413,0 $\pm$ 22,4	400,5 $\pm$ 35,2	363,1 $\pm$ 10,0	366,1 $\pm$ 13,8
D	423,5 $\pm$ 25,4	402,8 $\pm$ 37,1	407,4 $\pm$ 7,5	381,0 $\pm$ 10,8
5	439,0 $\pm$ 28,7	531,0 $\pm$ 43,7	522,3 $\pm$ 17,1 a	440,5 $\pm$ 26,5 c
10	412,0 $\pm$ 29,6	426,0 $\pm$ 36,3	534,3 $\pm$ 24,2 ab	453,5 $\pm$ 17,5 c
15	398,5 $\pm$ 28,9	412,3 $\pm$ 24,7	513,0 $\pm$ 24,1 ab	437,6 $\pm$ 19,4 c
20	388,0 $\pm$ 14,4	440,0 $\pm$ 26,9	504,3 $\pm$ 17,2 a	442,1 $\pm$ 15,6 ac
25	376,0 $\pm$ 22,6	430,0 $\pm$ 23,5	480,3 $\pm$ 21,5 a	466,4 $\pm$ 6,3 a
30	379,5 $\pm$ 19,7	445,8 $\pm$ 29,4	477,3 $\pm$ 19,0 a	498,8 $\pm$ 18,5 a
35	402,0 $\pm$ 19,8	411,0 $\pm$ 18,7	473,6 $\pm$ 15,2 ab	496,3 $\pm$ 20,0 ab
40	374,5 $\pm$ 15,4	401,3 $\pm$ 12,2	455,0 $\pm$ 18,1 ab	509,6 $\pm$ 20,7 ab



**Figura 24.** Tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrixã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após adição de rianodina e ácido láctico (Ri-AL). D: Fc registrada após adição de rianodina. Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 11.** Valores médios do tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) de tiras ventriculares de matrixã, *Brycon cephalus*, registrados durante 40 min em condições controle (grupo Ctrl -  $n = 10$ ), após adição de 22 mM de ácido láctico (grupo AL -  $n = 10$ ), após adição de 1 mM de amiloride e 22 mM de ácido láctico (grupo Am-AL -  $n = 10$ ) e após adição de 10  $\mu$ M de rianodina e 22 mM de ácido láctico (grupo Ri-AL -  $n = 10$ ). Médias  $\pm$  E.P. D corresponde à Fc registrada após adição de amiloride ou rianodina. a: diferença significativa em relação ao grupo Ctrl; b: diferença significativa em relação ao grupo AL. ( $P < 0,05$ ).

Tempo (min)	THR (ms)			
	Ctrl	AL	Ri-AL	Am-AL
0	243,5 $\pm$ 15,6	264,3 $\pm$ 20,4	304,5 $\pm$ 20,8	286,4 $\pm$ 9,3
D	242,6 $\pm$ 15,4	268,8 $\pm$ 18,6	308,0 $\pm$ 17,5 a	327,3 $\pm$ 16,9 ab
5	223,0 $\pm$ 16,8	280,0 $\pm$ 21,2	289,3 $\pm$ 30,8	339,9 $\pm$ 11,4 ab
10	233,0 $\pm$ 16,5	322,0 $\pm$ 27,5 a	319,6 $\pm$ 42,5 a	347,9 $\pm$ 10,9 a
15	219,5 $\pm$ 13,4	334,3 $\pm$ 27,3 a	332,5 $\pm$ 45,3 a	352,1 $\pm$ 7,2 a
20	230,0 $\pm$ 13,9	323,8 $\pm$ 22,4 a	367,5 $\pm$ 25,1 a	352,0 $\pm$ 4,6 a
25	219,5 $\pm$ 17,1	313,3 $\pm$ 19,8 a	340,5 $\pm$ 28,5 a	357,9 $\pm$ 7,1 a
30	216,0 $\pm$ 17,3	297,5 $\pm$ 19,8 a	320,1 $\pm$ 20,8 a	370,0 $\pm$ 17,4 ab
35	216,5 $\pm$ 18,2	292,3 $\pm$ 17,8 a	339,5 $\pm$ 36,1 a	392,4 $\pm$ 22,9 ab
40	216,5 $\pm$ 15,8	281,8 $\pm$ 19,5 a	319,6 $\pm$ 17,7 a	388,6 $\pm$ 27,4 ab

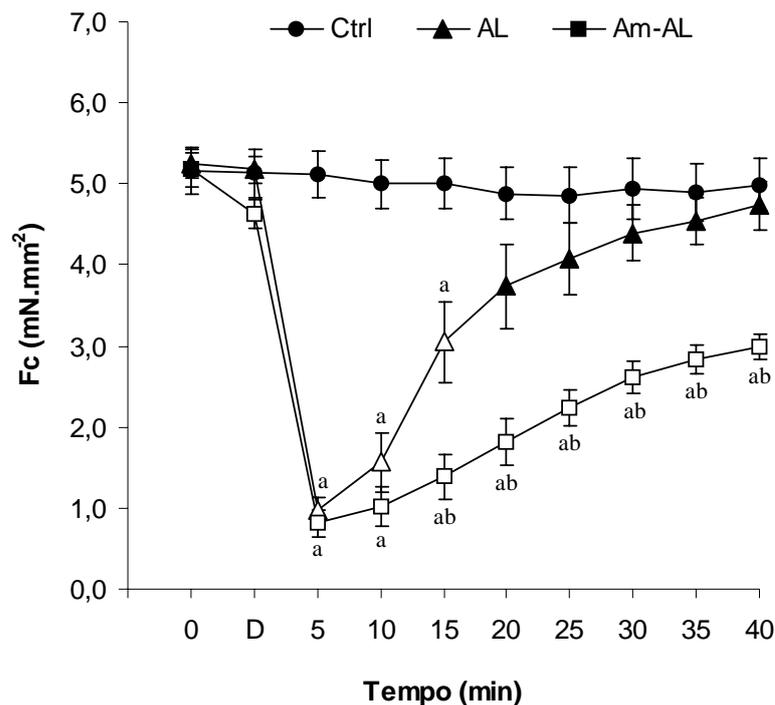


**Figura 25.** Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após adição de rianodina e ácido láctico (Ri-AL). D: Fc registrada após adição de rianodina. Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. ( $P < 0,05$ ).

#### 4.5. Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ (NHE).

Os valores médios da força de contração ( $F_c - \text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) desenvolvida pelas tiras ventriculares de matrinxã, *Brycon cephalus*, estimulados a 0,2 Hz, ao longo do tempo de experimental (40 min), nos grupos controle (Ctrl -  $n=10$ ), ácido láctico (AL -  $n=10$ ) e ácido láctico com amiloride (Am-AL -  $n=10$ ) são apresentados na tabela 9 e representados graficamente na figura 26.

No grupo Am-AL, a  $F_c$  inicial ( $5,2 \pm 0,2 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) sofreu redução para  $4,6 \pm 0,2 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$  após exposição ao cloridrato de amiloride por 30 min. Após adição de ácido láctico, os valores de  $F_c$  de Am-AL foram semelhantes aos obtidos para AL nos primeiros 5 min experimentais, mas, apesar da tendência de elevação, mantiveram-se inferiores aos de AL no intervalo de tempo compreendido entre o 15º e o 40º min, não recuperando os valores iniciais, diferente do grupo AL.



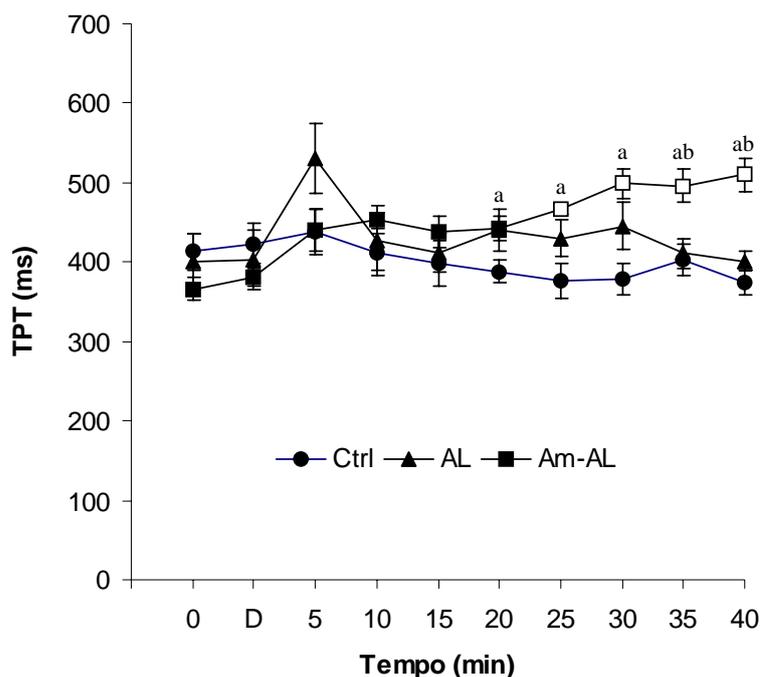
**Figura 26.** Força de contração isométrica ( $F_c$  -  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) de tiras ventriculares de matrinxã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido láctico (AL) e após adição de amiloride e ácido láctico (Am-AL). D:  $F_c$  registrada após adição de amiloride. Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. ( $P < 0,05$ ).

Os valores médios dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR - ms) dos grupos controle (Ctrl -  $n=10$ ), ácido láctico (AL -  $n=10$ ) e ácido láctico com amiloride (Am-AL -  $n=10$ ) são apresentados nas tabelas 10 e 11 e representados graficamente nas figuras 27 e 28.

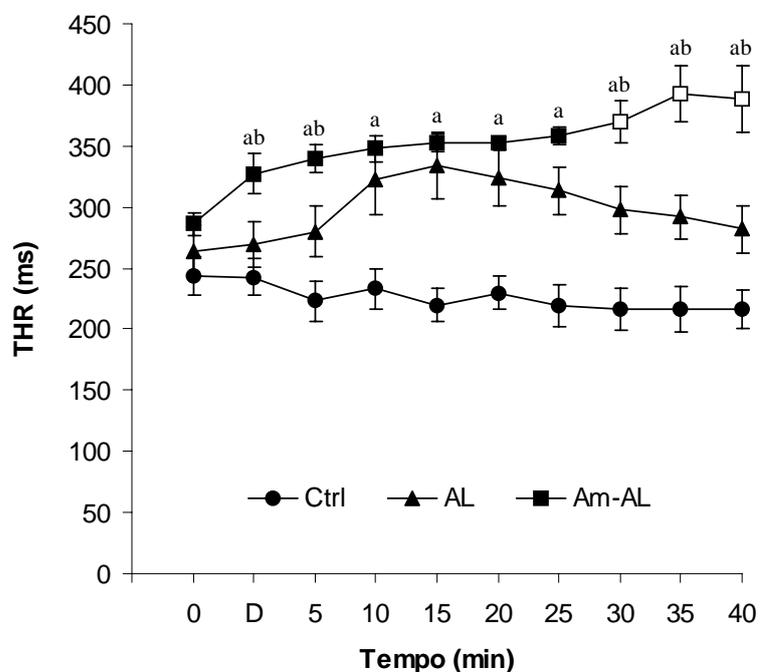
A adição de amiloride não alterou os valores de TPT iniciais, o mesmo acontecendo após a adição de ácido láctico até o 20º minuto, a partir o qual, o TPT aumentou significativamente. Os valores de TPT de Am-AL foram superiores aos registrados para Ctrl a partir do 20º min e aos do grupo AL no 35º e 40º minutos experimentais.

Da mesma forma que ocorrido com o TPT, adição de amiloride não alterou os valores de THR iniciais, o mesmo acontecendo após a adição de ácido láctico até o 30º minuto, a partir o qual, o THR aumentou significativamente. Entretanto, os valores de THR de Am-AL foram significativamente superiores aos de Ctrl desde a adição de amiloride até o final dos 40 min de exposição ao ácido láctico. Tais valores também foram superiores aos apresentados por AL quando a amiloride é adicionada e no 5º, 30º, 35º e 40º minutos experimentais.

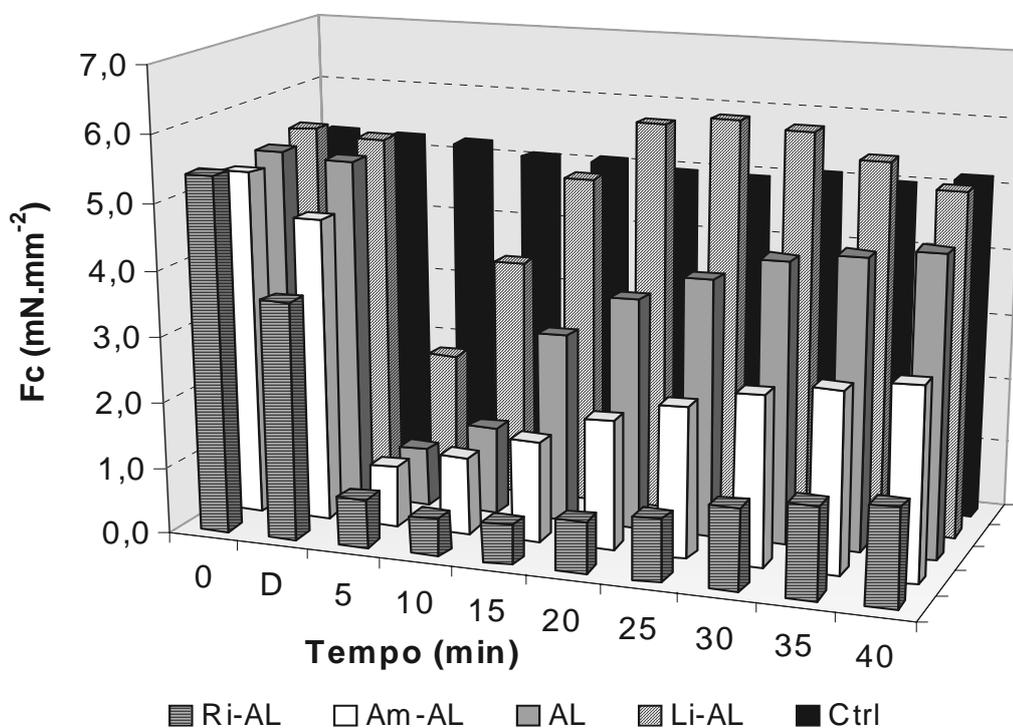
Uma comparação entre o efeito dos diferentes tratamentos experimentais sobre a  $F_c$  é mostrada na figura 29.



**Figura 27.** Tempo para que o pico de força seja atingido (TPT - ms) pelas tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido lático (AL) e após adição de amiloride e ácido lático (Am-AL). D: Fc registrada após adição de amiloride. Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. ( $P < 0,05$ ).



**Figura 28.** Tempo para 50% de relaxamento (THR - ms) das tiras ventriculares de matrizã em condições controle (Ctrl), após adição de ácido lático (AL) e após adição de amiloride e ácido lático (Am-AL). D: Fc registrada após adição de amiloride. Médias  $\pm$  E.P. Símbolos vazios: diferença em relação aos valores iniciais; a: diferença em relação ao grupo Ctrl; b: diferença em relação ao grupo AL. ( $P < 0,05$ ).



**Figura 29.** Diagrama comparativo do efeito dos diferentes tratamentos, combinados ou não ao ácido láctico, na força de contração isométrica das tiras ventriculares de matrinxã.

## 5. Discussão.

### 5.1. Efeitos do Tempo Experimental e da Acidose Lática.

O grupo controle não apresentou redução significativa da Fc, do TPT e do THR ao longo dos 40 min experimentais. Dessa forma, o tempo experimental (40 min), no qual foram realizados os registros dos dados, mostrou-se adequado para a obtenção dos resultados.

A adição de ácido lático às tiras ventriculares do matrinxã produziu uma curva inotrópica bifásica: uma redução inicial seguida por uma recuperação absoluta da Fc, similar à encontrada em mamíferos, répteis e anfíbios. Desta forma, pode-se sugerir que o miocárdio ventricular de matrinxã mostra-se tolerante a acidose lática, pois apresenta mecanismos que compensam seus efeitos inotrópicos negativos.

Conforme descrito anteriormente, a ativação dos miofilamentos durante o acoplamento E-C ocorre em resposta a um aumento da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$ , o qual pode depender tanto da mobilização do  $Ca^{2+}$  intracelular proveniente do retículo sarcoplasmático (RS) quanto do influxo de  $Ca^{2+}$  pela sarcolema (SL), através dos canais de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependentes (canais L) e do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) (HOVE-MADSEN et al., 2000). Por outro lado, o músculo cardíaco relaxa por meio da redução dos níveis citosólicos de  $Ca^{2+}$  até os níveis diastólicos de repouso principalmente por seu transporte para o espaço extracelular através da SL (especialmente via NCX) ou para o RS pela atividade bombeadora da  $Ca^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA).

Diferentes hipóteses para explicar tanto a redução abrupta quanto a recuperação da Fc causadas pela acidose têm sido testadas em diferentes grupos vertebrados. Entre as mais significativas para explicar a redução da Fc, extraídas de diferentes trabalhos, estão: a redução do influxo de  $Ca^{2+}$  via canal tipo L; redução da responsividade do aparato contrátil ao  $Ca^{2+}$ ; redução da liberação de cálcio-cálcio induzida (CICR) pelo RS. Da mesma forma, a recuperação da contratilidade poderia ser explicada pelo aumento na liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares, dada a maior oferta de  $Ca^{2+}$  ao RS, ativação do trocador  $Na^+/H^+$  (NHE) e conseqüente ativação do modo reverso do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX), que também contribuiria para o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  (FABIATO & FABIATO, 1978; DRIEDZIC & GESSER, 1994 GESSER & JORGENSEN, 1982; MATTIAZZI & CINGOLANI, 1977a; MATTIAZZI & CINGOLANI, 1977b; PEREZ, 1993; HOGLUND & GESSER, 1987; GESSER & POUPA, 1983; HULME & ORCHARD, 1998; ORCHARD et al.

1987, 1990, 1991; HARRISON et al., 1992; KENTISH & XIANG, 1997; CRAMPIN & SMITH, 2006).

Segundo Hulme & Orchard (1998), a acidose em miócitos ventriculares de rato produz aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico, aumento da amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente e redução do declínio do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente. Como consequência direta, ocorre um aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e, conseqüentemente, do estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS que é o responsável pelo aumento da amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente (ORCHARD 1987; HARRISON et al., 1992). A redução da capacidade tamponante das miofibrilas ao  $\text{Ca}^{2+}$ , do mecanismo de liberação de cálcio-cálcio induzida (CICR) e o comprometimento da recaptção do  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA explicam os efeitos da acidose na contratilidade cardíaca de rato.

Um outro fator do aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico, também importante, é o aumento no influxo de  $\text{Na}^+$ , por meio do acionamento do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) devido ao aumento dos íons  $\text{H}^+$  no ambiente intracelular durante acidose. Esse trocador, além de permitir a restauração do  $\text{pH}_i$ , produz o aumento do influxo do  $\text{Na}^+$  e, portanto, o conseqüente acionamento do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) no seu modo reverso, o que aumenta a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  disponível à SERCA do RS, contrabalançando os efeitos negativos da acidose na recaptção do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (BOUNTRA & VAUGHAN-JONES, 1989; HARRISON et al., 1992).

Em sapo, a redução da Fc parece menos pronunciada do que a ocorrida nos mamíferos e a recuperação excede os valores iniciais (MATTIAZZI & CINGOLANI, 1977a). A redução da responsividade miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$  é o fator preponderante verificado na redução da Fc durante o início da exposição das tiras ventriculares do anfíbio *Buffo arenarum* Hensel a acidose hipercápnica. A recuperação da Fc é independente da recuperação do pH e os mecanismos sarcolemais são os responsáveis pela recuperação: a redução do tamponamento miofibrilar e o conseqüente aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , devido ao influxo pelos canais L e, principalmente, ao acionamento do NCX no modo reverso pelo prolongamento do P.A. (SALAS et al., 2006). Embora seja capaz de contribuir com ambas as funções: recaptção e influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ; o NCX é o principal mecanismo de extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  nos miócitos cardíacos, estando intimamente envolvido com o relaxamento, especialmente em preparações em que o RS é pouco desenvolvido (HUME & UEHARA, 1986).

A depressão da força por acidose varia bastante entre as diferentes espécies (DRIEDZIC & GESSER, 1994). Segundo Poole-Wilson (1982), a geração de tensão por miofibrilas isoladas em concentração fixa de cálcio é reduzida em condições de acidose devido a uma redução do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ). Segundo Kass & Kwan (1993), o ion  $\text{H}^+$  reduz a probabilidade de abertura dos canais voltagem-dependentes do tipo L, o que reduz o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através desse canal. Em músculo papilar de furão, por exemplo, tanto o

influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  quanto o mecanismo de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -induzida foram deprimidos pela acidose (DRIEDZIC & GESSER, 1994, ORCHARD et al, 1991).

Para Fabiato & Fabiato (1978), a principal razão para o decréscimo da força desenvolvida durante acidose é que os íons hidrogênio inibem a ligação do cálcio à troponina C (TnC) de maneira competitiva. Trabalhando com miócitos ventriculares isolados de ratos, Hulme & Orchard (1998) não observaram redução do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais L e atribuíram a redução inicial da Fc à redução da responsividade miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Mattiazzi et al. (2006), também não observaram variação na amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente em tiras ventriculares e miócitos isolados de *B. arenarum*, corroborando a idéia de que nos anfíbios a redução da responsividade miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$  é a responsável pela redução inicial da Fc verificada logo após a exposição às condições de acidose. Contudo, segundo Yuan & Bers (1994), um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ativaria a proteína quinase  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina-dependente, a qual fosforila diversas proteínas envolvidas no manejo de  $\text{Ca}^{2+}$ , compensando a redução do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais L pela acidose, mascarando os efeitos negativos da acidose no influxo sarcolemal de cálcio.

Segundo Kentish & Xiang (1997), a acidose prejudica a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS devido a um efeito negativo direto dos íons  $\text{H}^+$  nos canais de rianodina do RS e na recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA. Hulme & Orchard (1998) demonstram que, em miócitos isolados de ratos, a SERCA é inibida pela acidose, mas este efeito foi compensado pelo aumento da oferta de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular com um conseqüente aumento da quantidade de cálcio estocado no RS. Adicionalmente, Philipson & Nishimoto (1982) demonstraram que a acidose prejudica a atividade do trocador NCX em vesículas sarcolemais de cães.

No presente trabalho, observou-se a ocorrência de contrações espontâneas esporádicas logo após a adição do ácido láctico, o que, segundo Bers (2002), é um indício de sobrecarga no estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, corroborando os achados de Hulme & Orchard (1998).

Segundo Palty et al. (2004), a presença de Li na solução fisiológica pode promover tanto o bloqueio da atividade do NCX, reduzindo a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  do miócito, quanto a reversão da atividade deste trocador e, conseqüentemente, um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (PALTY et al, 2004). Contudo, tal maior oferta de  $\text{Ca}^{2+}$  às tiras ventriculares do grupo Li-AL não foi capaz de impedir a redução da Fc verificada nos minutos iniciais de exposição ao ácido láctico. Assim, se o aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  não impede a redução da Fc, é provável que tal aumento seja necessário, mas não seja suficiente para a recuperação da Fc, sugerindo que no matrinxã, a redução da responsividade miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$  seja um fator decisivo para a ocorrência dessa redução inicial da Fc verificada logo após a exposição ao ácido láctico.

No presente trabalho, o grupo AL não apresentou diferenças significativas no tempo para que o pico de força seja atingido (TPT) ao longo dos 40 min experimentais.

Assim, a acidose láctica parece não prejudicar os mecanismos envolvidos com o desenvolvimento da contração, enquanto que o aumento sustentado no tempo para 50% de relaxamento (THR) sugere que a acidose prejudica fundamentalmente os mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento do relaxamento cardíaco.

Contudo, a avaliação da razão TPT/Fc do grupo AL revela um aumento significativo deste parâmetro do 5<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> min, diferente do observado para os valores absolutos de TPT. Assim, o ácido láctico parece prejudicar, também, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da contração. Matematicamente, a razão TPT/Fc parece, também, ser uma forma tão adequada de caracterizar um registro de força de contração isométrica, quanto pela avaliação dos valores absolutos. Da mesma forma, a avaliação dos valores da razão THR/Fc apresentados pelo grupo AL aumentou significativamente do 5<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> em relação ao valor inicial, diferente do observado para os valores absolutos de THR, que mostram um aumento sustentado a partir do 10<sup>o</sup> min. Portanto, a acidose láctica prejudica a ocorrência dos mecanismos envolvidos tanto na contração quanto no relaxamento cardíaco do matrinxã, contribuindo para a redução da performance cardíaca dessa espécie sob tais condições.

A discussão pormenorizada dos mecanismos afetados pela acidose láctica encontra-se nas seções seguintes.

## 5.2. Papel do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX).

O NCX é uma proteína transmembrana que transporta Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> e é um importante regulador da contratilidade cardíaca em mamíferos, transportando 1 íon Ca<sup>2+</sup> para fora da célula em troca de 3 íons Na<sup>+</sup>, permitindo, assim, a redução do Ca<sup>2+</sup> intracelular e, conseqüentemente, o relaxamento cardíaco. A direção do movimento de íons através do NCX depende do potencial de membrana e do gradiente químico para estes íons, podendo ser revertida, contribuindo com Ca<sup>2+</sup> para a contração cardíaca ao final do potencial de ação (P.A.).

O NCX apresenta elevada importância no relaxamento das células musculares cardíacas, funcionando, no seu modo normal, como principal meio para o efluxo de Ca<sup>2+</sup> após a contração (VORNANEN, 1999). Porém, em espécies com retículo sarcoplasmático funcional, o influxo de Ca<sup>2+</sup> pelo NCX pode funcionar como disparador da liberação massiva de Ca<sup>2+</sup> pelo RS (VORNANEN et al., 1994; LEVI et al., 1994) e, em vertebrados inferiores dependentes do Ca<sup>2+</sup> extracelular para a ativação da contração, esta corrente pelo NCX pode ser um importante mecanismo para a entrada de cálcio para a

contração (MULLINS, 1979; FAN et al., 1996), mesmo na presença da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais tipo L.

Funcionalmente, o NCX é considerado cataliticamente inerte a cátions monovalentes inorgânicos, como o  $\text{Li}^+$ , que é frequentemente utilizado em soluções livres de sódio para estudar sua atividade, principalmente para revertê-la (PALTY et al., 2004). Porém, segundo os mesmos autores, diversos estudos descrevem um significativo efeito do  $\text{Li}$  extracelular no efluxo do  $\text{Ca}^{2+}$ , ou por interagir com algum sítio regulatório do trocador NCX, ou por participar da troca  $\text{Li}/\text{Ca}^{2+}$  mediada por um trocador, ainda não identificado, distinto do NCX. Contudo, a representatividade desse distinto trocador nos miócitos de peixes carece de investigação pormenorizada.

A utilização do  $\text{LiCl}$  em substituição ao  $\text{NaCl}$  na solução fisiológica (grupo Li) causou aumento da Fc em relação aos valores iniciais, que deve ter ocorrido pelo aumentado influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  por meio da atividade reversa do trocador NCX. A combinação de  $\text{LiCl}$  com ácido láctico (grupo Li-AL) fez com que a Fc se comportasse de forma similar à registrada para o grupo AL, ou seja, redução no 5º min, apesar da Fc de Li-AL ser significativamente superior a do grupo AL ao longo dos 40 min experimentais. Além disso, no grupo Li-AL a recuperação dos valores iniciais ocorreu mais rapidamente. Parece que o incremento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular nos miócitos do matrinxã, como nos mamíferos e anfíbios, não impede a redução inicial da Fc, porém parece fundamental para a recuperação da Fc verificada durante acidose láctica. No entanto, esse incremento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  não parece ser ocasionado pela atuação desse trocador no seu modo reverso. A redução do tamponamento miofibrilar e o prejuízo dos mecanismos envolvidos na recaptção devem ser os responsáveis por esse incremento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Os valores de THR do grupo Li aumentaram significativamente a partir do 25º min, e foram significativamente superiores aos do grupo Ctrl, o que demonstra a importância funcional do NCX para o desenvolvimento do relaxamento cardíaco do matrinxã.

Como descrito acima, Philipson & Nishimoto (1982) verificaram que a acidose prejudica a atividade do trocador NCX em vesículas sarcolemais de cães. A redução do efluxo de cálcio *via* NCX ocorre por meio da interação competitiva do  $\text{H}^+$  em um importante sítio de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  neste trocador. Contudo, segundo Terracciano & McLeod (1994), o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é reduzido devido ao acionamento do NCX no seu modo reverso *via* trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE).

A substituição de  $\text{NaCl}$  por  $\text{LiCl}$  não alterou os valores do TPT nem da razão TPT/Fc no grupo Li, o que demonstra a menor importância do trocador NCX para o desenvolvimento da contração do que para o relaxamento. Porém, alterou os valores do TPT e da razão TPT/Fc quando combinado ao ácido láctico (grupo Li-AL). Tais resultados

demonstram que a acidose láctica prejudica os mecanismos envolvidos com a contração em um sítio diferente do NCX.

No grupo Li-AL, o THR também aumentou significativamente no 25º min. Tais valores foram significativamente superiores aos obtidos para o grupo Ctrl e aos obtidos para AL. A acidose láctica torna mais lento o processo do relaxamento cardíaco e a presença do LiCl compromete ainda mais a velocidade do relaxamento. O trocador NCX, ativado no seu modo normal (efluxo do  $\text{Ca}^{2+}$ ) parece desempenhar um papel relevante na homeostasia do cálcio intracelular durante a acidose láctica, o que deve contribuir para a recuperação da velocidade do relaxamento cardíaco prejudicada pela acidose.

Os valores da razão THR/Fc do grupo Li foram superiores aos do grupo Ctrl a partir do 20º min. No grupo Li-AL, esta razão aumentou significativamente em relação aos valores iniciais no 5º e 10º min, porém significativamente inferiores aos apresentados por AL nesse mesmo intervalo de tempo. Assim, o incremento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular devido à reversão da atividade do NCX causada pelo  $\text{Li}^+$  parece ter sido o responsável pelo aumento da Fc e, conseqüentemente, pela redução da razão THR/Fc no grupo Li-AL.

Cabe ressaltar que, em mamíferos, vários subtipos de NCX foram descritos, sendo que a forma de ação de cada um deles pode variar consideravelmente (PALTY, 2004). Não se têm, na literatura, dados disponíveis sobre possíveis subtipos do NCX em peixes, mas, se os mesmos também estiverem presentes, talvez possam explicar as diferenças nas respostas obtidas no presente trabalho em relação àquelas descritas para mamíferos.

Vários autores apontam que a afinidade da SERCA pelo cálcio é dependente do pH, tendo sua atividade de recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular reduzida em condições de acidose intracelular (NAKAMURA & SCHWARTZ, 1972; FABIATO & FABIATO, 1978; MANDEL & SCHWARTZ, 1982). Portanto, a acidose parece prejudicar o relaxamento cardíaco por atuar negativamente na recaptção do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pela SERCA do RS. O papel do RS neste processo será discutido posteriormente.

### **5.3 Papel do cálcio extracelular.**

Segundo Chapman (1983), a variação da força de contração do músculo cardíaco envolve um número variável de pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina, que irão requerer quantidades variáveis de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Essa alteração na força de contração pode ser obtida alterando-se as propriedades de ligação das proteínas contráteis

ao cálcio, por exemplo, pela alteração na quantidade disponível deste íon e pela estimulação adrenérgica.

Diversos estudos têm comprovado que a contratilidade cardíaca da maioria dos peixes é dependente da concentração extracelular de cálcio, refletindo a importância dos movimentos transarcolemais de  $\text{Ca}^{2+}$  para o acoplamento E-C cardíaco nestes animais (TIBBITS et al., 1992, DRIEDZIC & GESSER, 1994; VORNANEN, 1996).

Segundo Olle (2007), a contração ventricular do matrinxã é dependente dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (do retículo sarcoplasmático - RS), assim como do fluxo deste íon através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L da sarcolema. No presente trabalho, a importância do cálcio extracelular para a contração cardíaca de *Brycon cephalus* pôde ser evidenciada pela avaliação dos resultados da remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular na Fc. A remoção do cálcio extracelular (grupo ØCa) resultou numa redução da Fc inicial de ~54% no 5º min, redução esta que se manteve ao longo do tempo experimental, atingindo ~4,2% no 40º min, corroborando os resultados de Olle (2007).

A adição do ácido láctico produziu uma redução da Fc mais acentuada no grupo ØCaAL do que no grupo ØCa nos primeiros 15 min de exposição (redução ~89% na Fc inicial). Da mesma forma, o grupo ØCaAL apresentou valores significativamente inferiores ao grupo AL a partir do 15º min. Dessa forma, o ácido láctico parece, também, prejudicar o desenvolvimento da Fc por atuar negativamente em sítios diferentes dos canais L. Com base nestes resultados, pode-se sugerir que nas tiras ventriculares do matrinxã, a redução inicial da Fc ocorre concretamente pela redução da sensibilidade miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$ , como nos mamíferos e nos anfíbios estudados.

#### 5.4. Papel do Retículo Sarcoplasmático.

Como discutido anteriormente, a utilização do RS como armazenador e fornecedor de cálcio para o aparato contrátil varia grandemente entre as classes de vertebrados, entre diferentes espécies de um mesmo grupo filogenético e até mesmo entre as fases do desenvolvimento ontogenético de um indivíduo (BERS, 2001). O RS é bem desenvolvido em miócitos de mamíferos e aves, onde é a principal fonte e reservatório do  $\text{Ca}^{2+}$  ativador. Nos vertebrados ectotérmicos e em mamíferos neonatos, o RS cardíaco é relativamente esparso e tanto a contração quanto o relaxamento cardíaco são mais dependentes da entrada e saída transarcolemais de  $\text{Ca}^{2+}$  (FABIATO, 1983; BOSSEN & SOMMER, 1984; VORNANEN, 1996). A contribuição relativa do RS como fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  para o aparato contrátil pode ser examinada utilizando-se a rianodina, um alcalóide que se

liga aos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS e inibe a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ . Experimentos com células intactas demonstraram que a rianodina mantém os canais de cálcio do RS parcialmente abertos, prevenindo o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  em seu interior (BERS et al., 1987).

A musculatura cardíaca de várias espécies de peixes como a carpa cruciana, *Carassius carassius* (VORNANEN, 1989), o “sea-raven”, *Hemitripterus americanus*, o bacalhau, *Gadus morhua* (DRIEDZIC & GESSER, 1988), a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (COSTA et al., 2000), e o amborê de poças de maré, *Bathygobius soporator* (RANTIN et al., 1998), têm sido descritas como insensíveis à rianodina. Por outro lado, em espécies ativas, a rianodina reduziu o desenvolvimento de força em ~20% na cavala do Pacífico, *Scomber japonicus* (SHIELS & FARRELL, 2000), ~30% no atum “skipjack”, *Katsuwonus pelamis* (KEEN et al., 1992), ~25% no muçum, *Synbranchus marmoratus* (ROCHA et al., 2007) e ~40% no atum “yellowfin”, *Thunnus albacares* (SHIELS et al., 1999) e no pacu, *Piaractus mesopotamicus* (ANELLI-JR et al., 2004).

A participação do RS no manejo de cálcio de peixes de ambientes tropicais tem-se mostrado mais variável, não seguindo uma correlação tão direta entre nível de atividade do animal versus funcionalidade do RS como a descrita para animais de ambientes temperados. Ilustrativos a este respeito são os resultados obtidos para espécies Neotropicais como os teleósteos traíra, *Hoplias malabaricus* (OLLE et al., 2003; RIVAROLI et al., 2006), pacu, *Piaractus mesopotamicus* (ANELLI-JR et al. 2004), curimatá, *Prochilodus lineatus* (RIVAROLI et al., 2006), e muçum, *Synbranchus marmoratus* (ROCHA et al. 2006,2007), e para o dipnóico pirambóia, *Lepidosiren paradoxa* (COSTA et al., 2004), cujos RS mostraram-se altamente funcionais, a despeito dos diversos níveis de atividade das espécies em questão. Dessa forma, um forte componente filogenético determinando a funcionalidade do RS não pode ser descartado (RIVAROLI, 2006).

A evidência de um RS funcional na temperatura em que a espécie ocorre naturalmente só havia sido descrita para tiras atriais de atum (KEEN et al., 1992), levando-se em consideração que em diversas espécies o átrio normalmente apresenta RS mais desenvolvido do que o tecido ventricular, tanto estrutural como funcionalmente (BERS, 2001), e para tiras ventriculares do pacu (ANELLI-JR et al., 2004), do curimatá e do cascudo (RIVAROLI et al., 2006), da traíra (OLLE, 2003) e do muçum (ROCHA et al., 2007), espécies tipicamente Neotropicais.

Segundo Olle (2007), por meio da utilização da rianodina em condições fisiológicas, foi possível verificar uma importante diferença entre o coração de *B. cephalus* e da grande maioria das espécies de peixes de ambiente temperado estudadas até o momento. Os resultados obtidos demonstram que a contração ventricular dessa espécie é dependente dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  uma vez que foi observado o desaparecimento da potenciação pós-pausa da Fc ao utilizar-se este alcalóide.

Assumindo que, como em mamíferos, a mitocôndria não seja importante para suplementar o  $\text{Ca}^{2+}$  ativador do aparato contrátil e que as características de ligação da rianodina sejam similares em mamíferos e em peixes, o  $\text{Ca}^{2+}$  responsável pela ativação da contração no coração de *B. cephalus*, assim como no atum, pacu, muçum, curimatá e cascudo, deve vir de pelo menos duas fontes: o meio extracelular e o RS.

No grupo Ri-AL, a Fc inicial sofreu redução de ~33% após exposição ao alcalóide rianodina por 10 min, corroborando os resultados obtidos por Olle (2007). Após adição de ácido láctico, a Fc do grupo Ri-AL sofreu redução de ~82% no 5º min, redução esta de magnitude similar à apresentada pelo grupo AL (~80%). O fato da presença da rianodina não ter alterado a magnitude da redução da Fc apresentada pelo grupo AL sugere que a acidose láctica atue em um sítio diferente do RS, reforçando a hipótese de redução da responsividade miofibrilar como uma das principais causas da redução inicial da Fc causada pela acidose láctica.

Contudo, o grupo Ri-AL apresentou valores de Fc significativamente inferiores aos obtidos para grupo AL a partir do 10º, mantendo-se desta forma até o final do 40º min experimental, não sendo capaz de recuperar os valores iniciais de Fc. A rianodina bloqueou 58,3% da recuperação da Fc durante acidose láctica. Este resultado evidencia o papel do RS na recuperação da Fc durante acidose láctica em matrinxã, de forma similar à descrita para mamíferos por Harrison et al. (1992) e Nomura et al. (2002).

A adição de rianodina aumentou significativamente o TPT de Ri-AL, o mesmo acontecendo após a adição de ácido láctico, mantendo-se neste novo patamar até o 40º minuto. Além disso, os valores de TPT do grupo Ri-AL foram mais elevados que os dos grupos Ctrl e AL. Tais resultados apontam para a importância do RS no fornecimento de  $\text{Ca}^{2+}$ , desempenhando um papel importante para a recuperação da velocidade da contração, comprometida pela acidose láctica.

Os valores de THR dos grupos Ri-AL e AL não diferiram entre, mas foram significativamente superiores aos do grupo Ctrl. Tais resultados indicam que o comprometimento dos mecanismos envolvidos no relaxamento cardíaco deve ocorrer em um sítio diferente do RS ou que esse efeito negativo seja compensado pelo aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (HULME & ORCHARD, 1998).

Conforme discutido no item 5.1, a acidose prejudica a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS devido a um efeito negativo direto dos íons  $\text{H}^+$  nos canais de rianodina do RS e na recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA (KENTISH & XIANG, 1997). Segundo Hulme & Orchard (1998), a acidose em miócitos ventriculares de rato produz aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico, aumento da amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente e menor declínio do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente. Como resultado, ocorre um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e conseqüentemente, do estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS

que é o responsável pelo aumento da amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente (ORCHARD 1987; HARRISON et al, 1992).

Segundo Gesser & Poupa (1978), a hipercapnia causa uma liberação dos estoques intracelulares de cálcio, o que poderia resultar em um aumento do “pool” de  $\text{Ca}^{2+}$  disponível para a contração, contrabalançando os efeitos inotrópicos negativos do íon  $\text{H}^+$ . Esta hipótese é verificada pelo aumento estimado na atividade intracelular do cálcio em miocárdio de linguado e tartaruga (ambos recuperaram a força) e pela ausência de mudança em truta (GESSER & JORGENSEN, 1982).

Em seu estudo com o sapo *B. arenarum*, Salas et al. (2006) verificaram que a rianodina não foi capaz de bloquear a recuperação da Fc. Já em animais com RS funcional, o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico, dado o prejuízo nos mecanismos envolvidos no relaxamento, aumenta a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  disponível à SERCA, a despeito da inibição causada pela acidose. Assim, o estoque aumentado do RS aumenta o pool de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado em cada ciclo de contração e disponibiliza mais  $\text{Ca}^{2+}$  para as miofibrilas, compensando a redução do influxo  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais L causada pela acidose (ORCHARD et al., 1987; HARRISON et al., 1992).

Reforçando esta hipótese, Harrison et al. (1992), Hulme & Orchard (1998) e Nomura et al. (2002) verificaram que embora a acidose iniba tanto a tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS quanto sua liberação pelo mesmo (CICR), tais efeitos são compensados pelo aumento no conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  desta organela como efeito secundário da aumentada  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  causada pela acidose. Esses autores também verificaram que a inibição da função do RS pela rianodina abole completamente a recuperação da força contrátil, observada na ausência deste alcalóide.

Harrison et al. (1992) verificou, ainda, que a inibição do RS pela rianodina não teve efeito no aumento do  $\text{Na}^+$  intracelular observado em acidose e concluiu que tal aumento deveu-se à ativação do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pela acidose, hipótese testada pela utilização de amiloride. Tal efeito também foi testado no presente estudo e será discutido a seguir.

### **5.5. Papel do Trocador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ (NHE).**

O trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) é uma proteína sarcolemal que facilita o efluxo dos íons  $\text{H}^+$  e, portanto, está diretamente implicado no tamponamento do pH intracelular. O trocador é normalmente ativado pela acidose intracelular, embora uma variedade de outros estímulos como a trombina, a angiotensina II e agentes adrenérgicos possam modular sua ativação. Quando ativado, causa um aumento da  $[\text{Na}^+]_i$  que conseqüentemente promove um

influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  por meio da ativação do trocador NCX no seu modo reverso. Esse mecanismo é bastante explorado em trabalhos com mamíferos, pois a sobrecarga intracelular dos íons cálcio causado pela acidose parece ter uma importância relevante na isquemia do miocárdio (MOFFAT & KARMAZYN, 1993; HURTADO & PIERCE, 2000, 2001; PALANDOKEN & NANTZ, 2004, CHEN & KARMAZYN, 2004; SAINI & DHALLA, 2006).

O pH fisiológico dos miócitos de mamíferos é mantido em 7,1. Os prótons intracelulares são tamponados por tamponadores dependentes e independentes do  $\text{CO}_2$ , como os sistemas sarcolemais transportadores de íons. Estes incluem elementos alcalinizantes como o trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) e o co-transportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC); bem como elementos acidificadores como o trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (anionic exchanger - AE) e o trocador  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$ . Contudo, alguns autores demonstraram que a recuperação da Fc é completamente abolida pela amiloride, inibidora do trocador NHE, sugerindo um papel preponderante do trocador NHE na regulação do pH intracelular durante acidose (BOUNTRA & VAUGHAN-JONES, 1989; CAIRNS & ALLEN, 1992; HARRISON et al., 1992; MATTIAZZI et al., 2006).

A recuperação da Fc, em miócitos de gato, foi completamente abolida com o bloqueio do trocador NHE (PÉREZ et al., 1993). Em preparações ventriculares de sapo, o bloqueio do NHE não impediu a recuperação da Fc (MATTIAZZI et al., 2006). Cingolani et al. (1990), trabalhando com miócitos de furão, verificaram que a restituição do pH e a conseqüente restauração da sensibilidade miofibrilar são os candidatos responsáveis pela recuperação da Fc durante a acidose. Esse trocador, além de permitir a restauração do  $\text{pH}_i$  e, portanto, da responsividade miofibrilar, aumenta a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  disponível à SERCA do RS, contrabalançando os efeitos negativos da acidose na contratilidade (BOUNTRA & VAUGHAN-JONES, 1989; HARRISON et al., 1992; TERRACIANO & MACLEOD, 1994; PEREZ et al., 1995).

Contudo, o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pode aumentar mesmo na ausência do aumento do  $\text{Na}^+$  intracelular ou depois do bloqueio do NHE (ALLEN et al., 1984). Como já discutido, a redução do tamponamento miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$ , a redução da atividade da SERCA e a inibição do trocador NCX podem contribuir para o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]$  diastólico e, portanto, para o conteúdo do RS (MATTIAZZI et al., 2006).

Harrison et al. (1992), como já citado anteriormente, verificou que o rápido declínio da Fc causado pela acidose era seguido por uma recuperação lenta e parcial da mesma, acompanhada de aumentos no  $\text{Na}^+$  intracelular, no  $\text{Ca}^{2+}$  sistólico e diastólico e no conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. O bloqueio do RS pela rianodina aboliu a recuperação da Fc, mas não teve efeito sobre o aumento na  $[\text{Na}^+]_i$ . Entretanto, o aumento na  $[\text{Na}^+]_i$  e a recuperação da Fc foram abolidos pela amiloride. Baseados nesses resultados, esses autores concluíram que a principal causa da redução inicial da Fc durante a acidose é a redução da resposta das

proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  devida à redução do pH intracelular. A recuperação subsequente da Fc deveu-se à ativação do NHE pelo baixo pH intracelular, elevando a  $[\text{Na}^+]_i$ . Tal aumento na  $[\text{Na}^+]_i$  deve ativar o NCX e, conseqüentemente, aumentar a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

No presente estudo, a Fc inicial do grupo Am-AL sofreu redução de ~12% após exposição à amiloride por 30 min, sugerindo um papel do NCX como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  ao aparto contrátil. Após adição de ácido láctico, os valores de Fc de Am-AL foram semelhantes aos obtidos para o grupo AL nos primeiros 5 min experimentais, mas, apesar da tendência de elevação, mantiveram-se inferiores aos de AL, não havendo recuperação completa dos valores iniciais. A amiloride bloqueou 36,9% da recuperação da Fc durante acidose láctica, como descrito por Harrison et al. (1992) para miócitos de ratos. Este resultado indica que o trocador NHE desempenha um papel importante na recuperação da Fc em matrinxã.

A adição de amiloride não alterou os valores de TPT iniciais de matrinxã, o mesmo acontecendo após a adição de ácido láctico até o 20º minuto, a partir do qual, o TPT aumentou significativamente. Os valores de TPT de Am-AL foram superiores aos registrados para Ctrl e aos do grupo AL nos registros finais do tempo experimental. Apesar da função do NCX ser menos significativa que os canais tipo-L para o disparo da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS, o bloqueio do trocador NHE e, conseqüentemente, o bloqueio da ação do trocador NCX no seu modo reverso, prejudicou o influxo de cálcio durante o desenvolvimento da contração cardíaca.

Da mesma forma que ocorrido com o TPT, adição de amiloride não alterou os valores de THR iniciais, o mesmo acontecendo após a adição de ácido láctico até o 30º minuto, a partir do qual, o THR aumentou significativamente. Entretanto, os valores de THR de Am-AL foram significativamente superiores aos de Ctrl desde a adição de amiloride até o final dos 40 min de exposição ao ácido láctico. Tais valores também foram superiores aos apresentados por AL quando a amiloride é adicionada. Tais resultados apontam novamente, para a importância do NHE tanto para a recuperação da força de contração quanto para o relaxamento cardíaco durante a acidose láctica.

## 5.6. Considerações finais

A acidose tem marcantes efeitos na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e diferentes autores descreveram aumentos do  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico, aumentos da amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente e reduções no declínio do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente em mamíferos. Em sapos, resultados similares foram descritos, com exceção da redução do declínio do  $\text{Ca}^{2+}$

transiente. Como consequência direta dessas alterações no manejo do  $\text{Ca}^{2+}$ , ocorre um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que em matrinxã a acidose láctica possivelmente ativa mecanismos similares, causando os mesmos efeitos na redistribuição intracelular do cálcio.

Os resultados apresentados por este trabalho indicam que o matrinxã é tolerante à acidose láctica, pois apresenta mecanismos de ajustes celulares que contrabalançam os efeitos negativos da acidose láctica. A redução inicial da Fc parece consequência da redução da responsividade miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$ . O mecanismo de recuperação é parcialmente dependente da recuperação do pH, por meio da ativação do trocador NHE. Tal ativação aumentaria a  $[\text{Na}^+]_i$ , ativando o NCX em seu modo reverso e, conseqüentemente, aumentando a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , como descrito para mamíferos. Além disso, o presente trabalho demonstrou que em matrinxã, o RS desempenha um papel decisivo no aumento do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e, portanto, na recuperação da contratilidade cardíaca deprimida pela acidose.

Um esquema dos possíveis sítios de atuação da acidose nos miócitos cardíacos é mostrado na figura 30.

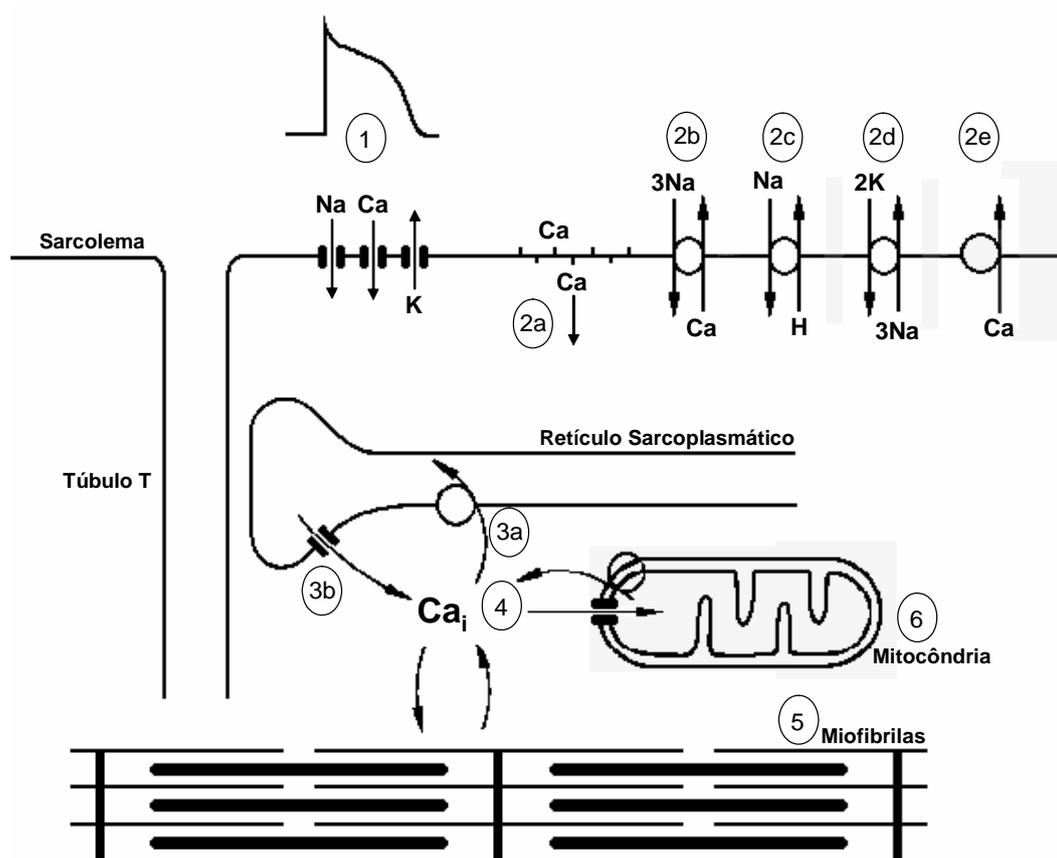


Figura 30. Possíveis sítios de ação do  $\text{H}^+$  na célula miocárdica: 1. Eletrofisiologia; 2a.  $\text{Ca}^{2+}$  ligado à sarcolema; 2b. Trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX); 2c. Trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE); 2d.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase; 3a.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA); 3b. Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do

retículo sarcoplasmático; 4.  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular; 5. Proteínas contráteis; 6. Metabolismo celular e função mitocondrial (Modificado de ORCHARD & KENTISH, 1990).

## 6. CONCLUSÕES.

No presente trabalho, o estudo da contratilidade miocárdica de *Brycon cephalus* (matrinxã) frente à exposição à acidose láctica permitiu as seguintes conclusões:

- a. O miocárdio ventricular de matrinxã é tolerante à acidose láctica, apresentando mecanismos que compensam seus efeitos inotrópicos negativos, o que evidenciado por sua resposta inotrópica bifásica: redução inicial da força de contração (Fc) seguida de recuperação completa da mesma, similar à encontrada em mamíferos.
- b. A redução inicial da Fc parece dever-se principalmente à redução da sensibilidade miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$ , como nos mamíferos e nos anfíbios estudados, uma vez que nem o bloqueio ou reversão da atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) pelo lítio nem a manipulação do cálcio extracelular alteraram tal resposta.
- c. O bloqueio da recuperação da Fc durante acidose láctica pela rianodina evidenciou o papel do retículo sarcoplasmático (RS) no aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e, portanto, na recuperação da contratilidade cardíaca deprimida pela acidose em matrinxã, de forma similar à descrita para mamíferos;
- d. O trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) desempenha um papel importante na recuperação da Fc em matrinxã, como descrito para miócitos de ratos e diferente do observado em sapos. Tal papel do NHE foi evidenciado pelo bloqueio da recuperação da Fc em acidose pela amiloride.

## 7. Referências Bibliográficas

AHO, E., VORNANEN, M. **Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and Ca<sup>2+</sup> uptake by sarcoplasmic reticulum in fish heart: effects of thermal acclimation.** *J. Exp. Biol.* 201, 525–532, 1998.

ALLEN D.G.; EISNER, D.A.; ORCHARD, C.H. **Factors influencing free intracellular calcium concentration in quiescent ferret ventricular muscle.** *J Physiol*; 350:615–30, 1984.

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*.** *J. Therm. Biol.*, v.29, pp.103-113, 2004.

BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M. & BERS, D.M. **Mitochondrial and sarcolemal Ca<sup>2+</sup> transport reduce [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes.** *J. Physiol.*, v. 453, pp. 591-608, 1992.

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A. & BERS, D.M. **Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes.** *Am. J. Physiol.*, v. 265, n. 34, pp. C533-C540, 1993.

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A. & BERS, D.M. **Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms.** *J. Physiol.*, v. 476, n. 2, pp. 279-293, 1994a.

BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M. & BERS, D.M. **Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems.** *J. Physiol.*, v. 476, n. 2, pp. 295-308, 1994b.

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A. & BERS, D.M. **A method to estimate mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in intact cardiac myocytes.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 29, pp. 1699-1707, 1996.

BENNET, A.F. **Activity metabolism of the lower vertebrates.** *A. Rev. Physiol.* 400, 447-469, 1978.

BERRIDGE, M.J. **Inositol trisphosphate and calcium signalling.** *Nature*, v. 361, pp. 315-325, 1993.

BERS, D.M. **Ca<sup>2+</sup> influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during postrest recovery.** *Am. J. Physiol.*, v. 248, pp. H366-H381, 1985.

BERS, D.M. **Ryanodine and the calcium content of cardiac SR assessed by caffeine and rapid cooling contractures.** *Am. J. Physiol.*, v. 253, pp. C408-C415, 1987.

BERS, D.M.; CHRISTENSEN, D.M. & NGUYEN, T.X. **Can Ca entry via Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange directly activate cardiac muscle contraction?** *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 20, pp. 405-414, 1988.

BERS, D.M. **Ca<sup>2+</sup> regulation in cardiac muscle.** *Med. Sci. Sports Exerc.*, v. 23, n. 10, pp. 1157-1162, 1991.

BERS, D.M.; BASSANI, J.W.M. & BASSANI, R.A. **Competition and redistribution among calcium transporting systems in rabbit cardiac myocytes.** *Cardiovasc. Res.*, v. 27, pp. 1772-1777, 1993.

BERS, D.M. **Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers (2a Ed.), 258p, 2001.

BERS, D.M.. **Cardiac excitation-contraction coupling** (insight review articles). *Nature* **415**, 198-205, 2002.

BLANCHARD, E.M.; SOLARO, R.J. **Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH.** *Circ. Res.* **55**, 382-391, 1984.

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

BOUNTRA, C.; VAUGHAN-JONES, R.D. **Effect of intracellular and extracellular pH on contraction in isolated, mammalian cardiac muscle.** *J Physiol.* **418**, 163–87, 1989.

BRITSKI, H.A. **Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática.** In: Poluição e Piscicultura. Faculdade de Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca CPRN, São Paulo, pp. 79-108, 1972.

CAIRNS, S.P.; WESTERBLAD, H.; ALLEN, D.G. **Changes in myoplasmic pH and calcium concentration during exposure to lactate in isolated rat ventricular myocytes.** *J Physiol.* May; 464: 561–574, 1993.

CHAPMAN, R.A. **Control of cardiac contractility at the cellular level.** *Am. J. Physiol* 245, n. 14, H535-H552, 1983.

CHEN L.; CHEN C.X.; GAN X.T.; BEIER N.; SCHOLZ W.; KARMAZYN M. **Inhibition and reversal of myocardial infarction-induced hypertrophy and heart failure by NHE-1 inhibition.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H381–H387, 2004.

CHUGUN, A., OYAMADA, T., TEMMA, K., HARA, Y.; KONDO, H. **Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage sites in the carp heart: comparison with the rat heart.** *Comp. Biochem. Physiol. A* 123, 61 -67, 1999.

CINGOLANI, H. E., KORETSUNE, Y.; MARBAN, E. **Recovery of contractility and pHi during respiratory acidosis in ferret hearts: role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange.** *Am. J. Physiol.* 259, H843-H848, 1990.

CINGOLANI, H. E.; KORETSUNE, Y.; MARBAN, E. **Recovery of contractility and pHi during respiratory acidosis in ferret hearts: role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange.** *Am. J. Physiol.* 259, H843-H848, 1990.

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

COSTA, M.J.; OLLE, C.D.; 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.

CRAMPIN, E.J.; SMITH, N.P. **A Dynamic Model of Excitation-Contraction Coupling during Acidosis in Cardiac Ventricular Myocytes.** *Biophysical Journal* Volume 90 May 3074–3090, 2006

CROCKER, C.E., FARRELL, A.P., GAMPERL, A.K; CECH, J.J. **Cardiorespiratory responses of white sturgeon to environmental hypercapnia.** *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R617-R628, 2000.

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

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

FABIATO, A.; FABIATO, F. **Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles.** *J. Physiol.* 276, 233-255, 1978.

FABIATO, A. **Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum.** *Am. J. Physiol.*, v. 245, n. 14, pp. C1-C14, 1983.

FAN J., SHUBA, Y.M., MORAD, M. **Regulation of cardiac sodium–calcium exchanger by beta-adrenergic agonists.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v 93, p. 5527–5532, 1996.

FARRELL, A. P., MACLEOD, K. R., DRIEDZIC, W. R.; WOOD, S. **Cardiac performance in the in situ perfused fish heart during extracellular acidosis:** interactive effects of adrenaline. *J. Exp. Biol.* **107**, 415-429, 1983.

FARRELL, A. P., MACLEOD, K. R.; SCOTT, C. **Cardiac performance of the trout ( *Salmo gairdneri*) heart during acidosis:** effects of low bicarbonate, lactate and cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.* **91A**, 271-277, 1988.

FARRELL, A.P., JONES, D.R. The Heart. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. & Farrell, A.P. Fish Physiology, v. XII(A): **The Cardiovascular System.** Academic Press, Inc., New York, p. 1-88, 1992.

FOEX, P.; FORDHAM, R.M.M. **Intrinsic myocardial recovery from the negative inotropic effects of acute hypercapnia.** *Cardiovascular Research.* 257-262, 1972.

FORBES, M.S.; SPERELAKIS, N. **Ultrastructure of lizard ventricular muscle.** *J. Ultrastruc. Res.*, n. 34, pp. 439-451, 1971.

GESSER, H.; JORGENSEN, E. **pHi contractility and Ca<sup>2+</sup>-balance under hypercapnic acidosis in the myocardium of different vertebrate species.** *J. Exp. Biol.* **96**, 405-412, 1982.

GESSER, H., POUPA, O. **The role of intracellular Ca<sup>2+</sup> under hypercapnic acidosis of cardiac muscle: comparative aspects.** *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 1127, 307-313, 1978.

GESSER, H.; POUPA, O. **Effects of different types of acidosis and Ca<sup>2+</sup> on cardiac contractility in the flounder (*Pleuronectes flesus*).** *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 131, 293-296, 1979.

GESSER, H.; POUPA, O. **Acidosis and Ca<sup>2+</sup> distribution in myocardial tissue of flounder and rat.** *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **143**, 245-251, 1981.

GESSER, H., POUPA, O. **Acidosis and cardiac muscle contractility:** comparative aspects. *Comp. Biochem Physiol.*, v. 76(A), p. 559-566, 1983.

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

GLADDEN, L.B. **Lactate uptake by skeletal muscle**. Exercise Sport Sci. Rev. 17: 115-155, 1989.

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

HACKBARTH, A. **Respostas metabólicas e de crescimento de matrinxãs *Brycon cephalus*, (Günter,1869) submetidos ao exercício sustentado**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, pp. 88, 2004.

HANSON, L.M.; FARRELL, A.P. **The hypoxic threshold for maximum cardiac performance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum) during simulated exercise conditions at 18°C**. J. Fish Biol. 71, 926-932, 2007.

HANSON, L.M , BAKER, D.W., KUCHEI, L.J., FARRELL, A.P., VAI, A.L., BRAUNER, C.J. **Intrinsic mechanical properties of the perfused armoured catfish heart with special reference to the effects of hypercapnic acidosis on maximum cardiac performance**. *The Journal of Experimental Biology* 212, 1270-1276, 2009.

HARRISON, S. M., FRAMPTON, J. E., MCCALL, E., BOYETT, M. R.; ORCHARD, C. H.. **Contraction and intracellular Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, and H<sup>+</sup> during acidosis in rat ventricular myocytes**. *Am. J. Physiol.* 262, C348-C357, 1992.

HARWOOD, C.L., HOWARTH, F.C., ALTRINGHAM, J.D., WHITE, E. **Rate-dependent changes in cell shortening, intracellular Ca<sup>2+</sup> levels and membrane potential in single, isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ventricular myocytes**. J. Exp. Biol., v. 203, p. 493-504, 2000.

HASENFUSS, G.; REINECKE, H.; STUDER, R.; PIESKE, B.; MEYER, M., DREXLER, H. & JUST, H. **Calcium cycling proteins and force-frequency relationship in heart failure**. Basic Res. Cardiol., v. 91, n. 2. pp. 17-22, 1996.

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

HOCHACHKA P.W & MOMMSEN, T.P. **Protons and anaerobiosis**. SCIENCE 219, 1391–1397,1983.

HOGLUND, L.; GESSER, H. **Electrical and mechanical activity in heart tissue of flounder and rainbow trout during acidosis**. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A, 543 -546, 1987.

HOVE-MADSEN, L. & GESSER, H. **Force-frequency relation in the myocardium of rainbow trout: effects of K<sup>+</sup> and adrenaline.** *J. Comp. Physiol. B*, 159: 61-69, 1989.

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-MADSEN, L. & TORT, L. **L-type Ca<sup>2+</sup> current and excitation-contraction coupling in single atrial myocytes from rainbow trout.** *Am. J. Physiol.*, v. 275, n. 44, pp. R2061-R2069, 1998.

HOVE-MADSEN, L., LLACH, A. & TORT, L. **Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchange activity regulates contraction and SR Ca<sup>2+</sup> content in rainbow trout atrial myocytes.** *Am. J. Physiol.*, v. 279, pp. R1856-R1864, 2000.

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

HULME, J.T., ORCHARD, C.H.. **Effect of acidosis on Ca<sup>2+</sup> uptake and release by sarcoplasmic reticulum of intact rat ventricular myocytes.** *The American Physiological Society*, 0363-6135, 1998.

HUME, J.R.; UEHARA, A. **'Creep currents' in single frog atrial cells may be generated by electrogenic Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange.** *J. Gen. Physiol.* 87, 857-884, 1986.

HURTADO, C.; PIERCE G.N. **Inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange at the beginning of reperfusion is cardioprotective in isolated, beating adult cardiomyocytes.** *J Mol Cell Cardiol* 32: 1897-1907, 2000.

HURTADO, C.; PIERCE G.N. **Sodium-hydrogen exchange inhibition: preversus post-ischemic treatment.** *Basic Res Cardiol* 96: 312-317, 2001.

JACKSON, D.C., ANDRADE, D.V.; ABE, A.S. **Lactate sequestration by osteoderms of the broad-nose caiman, *Caiman latirostris*, following capture and forced submergence.** *J. Exp. Biol.* 206, pp. 3601-3606, 2003.

JACKSON, D.C., ARENDT, E.A., INMAN, K.C., LAWLER, R.G., PANOI, G., WASSER, J.S. **<sup>31</sup>P-NMR study of normoxic and anoxic perfused turtle heart during graded CO<sub>2</sub> and lactic acidosis.** *Am J Physiol.* 260:R1130-R1136, 1991.

JACKSON, D.C., CROCKER, C.E.; ULTSCH, G.R. **Bone and shell contribution to lactic acid buffering of submerged turtles *Chrysemys picta bellii* at 3 °C.** *Am. J. Physiol.* 278, pp. R1564–R1571, 2000.

JACKSON, D.C. **Hibernating without oxygen: physiological adaptations of the painted turtle.** *J. Physiol.* **543**, 731-737, 2002.

JACKSON, D.C. **Surviving extreme lactic acidosis: the role of calcium lactate formation in the anoxic turtle** *Respiratory Physiology & Neurobiology*, V 144, Issues 2-3, pp 173-178, 2004

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

KALININ, A.L. **Função respiratória de tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*, em diferentes condições de O<sub>2</sub> ambiental:** Tomada de O<sub>2</sub> branquial e cutânea e medidas diretas e indiretas dos parâmetros ventilatórios. São Carlos, SP. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos. 1996.

KALININ, A; GESSER, H. **Oxygen consumption and force development in turtle and trout cardiac muscle during acidosis and high extracellular potassium.** *J. Comp. Physiol.* **172**, 145-151, 2002.

KASS, R.S; KWAN, Y.W. **Interactions between H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> Near Cardiac L-Type Calcium Channels:** evidence for independent channel-associated binding sites. *Biophysical Journal* **65**, 1188-1195, 1993.

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

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

KENTISH, J.; XIANG, J.Z. **Ca<sup>2+</sup>- and caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum in rat skinned trabeculae: effects of pH and Pi.** *Cardiovasc. Res.* **33**, 314–323, 1997.

KLAUTZ, R.J.M.; BAAN, J.; TEITEL, D.F. **The effect of sarcoplasmic reticulum blockade on the force/frequency relationship and systolic contraction patterns in the newborn pig heart.** *Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.)*, v. 435, pp. 130-136, 1997.

KORSMEYER, K.E., LAI, N.C., KNOWER, T., DEWAR, H., SHADWICK, R.E., GRAHAM, J.B. **Cardiovascular function in swimming yellowfin tuna (*Thunnus albacares*).** *Am. Zool.*, v. 33, pp. 33-44, 1993.

LEKNES, I.L. **Morphometric analysis of myocardial cells in a teleost.** *Anat. Anz.*, v. 155, pp. 169-172, 1984.

LEVI, A.J.; K. SPITZER, W., KOHMOTO, O.; BRIDGE, J.H. **Depolarization-induced Ca entry via Na-Ca exchange triggers SR release in guinea pig cardiac myocytes.** *Am. J. Physiol.* 266, H1422-H1433, 1994.

LILLYWHITE, H.B., ZIPPEL, K.C., FARRELL, A.P. **Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates.** *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 124:369-382, 1999.

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Ecological studies in tropical fishes communities.** *Cambridge: Cambridge Academic Press*, 382p, 1987.

MANDEL, F.; KRANIAS, E.G.; GRASSI de GENDE, A.; SUMIDA, M.; SCHWARTZ, A. **The effect of pH on the transient-state kinetics of Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. A comparison with skeletal sarcoplasmic reticulum.** *Circ. Res.* 50; 310-317, 1982.

MARBAN, E.; KUSUOKA, H. **Maximal Ca<sup>2+</sup>-activated force and myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity in intact mammalian hearts.** Differential effects of inorganic phosphate and hydrogen ions. *J. Gen. Physiol.* **90**, 609-623, 1987.

MARENCO, F.D.; WANG, S-Y; LANGER, G.A. **The effects of temperature upon calcium exchange in intact cultured cardiac myocytes.** *Cell Calcium*, v. 21, n. 4, pp. 263-273, 1997.

MATTIAZZI, A. R.; CINGOLANI, H. E. **Paradoxical effect of hypercapnia on toad heart muscle.** *Circ. Res.* 41, 117-122, 1977a

MATTIAZZI, A.R., CINGOLANI, H.E. **Biphasic effect of hypercapnia in myocardial contractility.** *Arch Int Physiol Biochim.* 85, 11-25, 1977b.

MATTIAZZI, A. R., CINGOLANI, H. E. and de CASTUMA, E. S. **Relationship between calcium and hydrogen ions in heart muscle.** *Am. J. Physiol.* 237, H497-H503, 1979.

MATTIAZZI, A.; VITTONI, L.; MUNDIÑA-WEILENMANN, C. **Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase: a key component in the contractile recovery from acidosis** *Cardiovascular Research* 73 648-656, 2006.

MAYLIE, J.; MORAD, M. **Evaluation of T- and L-type Ca<sup>2+</sup> currents in shark ventricular myocytes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 269: H1695-H1703, 1995.

McCALL, E.; ORCHARD, C.H. **The effect of acidosis on the interval-force relation and mechanical restitution in ferret papillary muscle.** *J. Physiol.*, v. 432, pp. 45-63, 1991.

MCKENZIE, D. J.; TAYLOR, E. W.; DALLA, V.A.Z.; STEFFENSEN, J.F. **Tolerance of acute hypercapnic acidosis by the European eel (*Anguilla anguilla*).** *J. Comp. Physiol.* **172B**, 339-346, 2002.

MIKAMI, A.; IMOTO, K.; TANABE, T.; NIDOME, T.; MORI, Y.; TAKESHIMA, H.; NARUMIYA, S.; NUMA, S. **Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel.** *Nature*, v. 340, n. 6230, pp. 230-233, 1989.

MILL, J.G.; VASSALLO, D.V. & LEITE, C.M. **Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle.** *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, v. 25, pp. 399-408, 1992.

MILLIGAN, C.L.; FARRELL, A.P. **Extracellular and intracellular acid-base status following strenuous activity in the sea raven (*Hemitripterus americanus*).** *J. Comp. Physiol. B* 156, 583-590, 1986.

MILLIGAN, C. L.; WOOD, C. M. **Intracellular and extracellular acid-base status and H<sup>+</sup> exchange with the environment after exhaustive exercise in the rainbow trout.** *J. Exp. Biol.* **123**, 93–121, 1986.

MILLIGAN, C.L.; GIRARD, S.S. **Lactate metabolism in rainbow trout.** *J. Exp. Biol.* 180: 175-193, 1993.

MISQUITTA, C.M.; MACK, D.P.; GROVER, A.K. **Sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves.** *Cell Calcium*, v. 25, n. 4, pp. 277-290, 1999.

MØLLER-NIELSEN, T. & GESSER, H. **Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling at 20 and 10 °C in rainbow trout myocardium.** *J. Comp. Physiol. B*, v. 162, pp. 526-534, 1992.

MOFFAT MP and KARMAZYN M. **Protective effects of the potent Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor methylisobutyl amiloride against post-ischemic contractile dysfunction in rat and guinea-pig hearts.** *J Mol Cell Cardiol* 25: 959–971, 1993.

MORAD, M. & ORKAND, R.K. **Excitation-contraction coupling in frog ventricle: evidence from voltage-clamp studies.** *J. Physiol.*, v. 219, pp. 167-189, 1971.

MULLINS, L. J. **The generation of electric currents in cardiac fibers by Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange.** *Am. J. Physiol.* 236, C103–C110, 1979.

MUÑOZ-CHÁPULI, R. & HAMLETT, W.C. **Epilogue: comparative cardiovascular biology of lower vertebrates.** *J. Exp. Zool.*, v. 275, pp. 249-251, 1996.

NAKAI, J.; OGURA, T.; PROTASI, F.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.; ALLEN, P.D.; BEAM, K.G. **Functional nonequality of the cardiac and skeletal ryanodine receptors.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 94, pp. 1019-1022, 1997.

NAKAMURA, Y.; SCHWARTZ, A. **The influence of hydrogen ion concentration on calcium binding and release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.** *J Gen Physiol* 59: 22-32, 1972.

NOMURA, N.; SATOH, H.; TERADA, H.; MATSUNAGA, M.; WATANABE, H.; HAYASHI, H.. **CaMKII-dependent reactivation of SR Ca<sup>2+</sup> uptake and contractile recovery during intracellular acidosis.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **283**, H193–203, 2002.

OBA, E.T; SANTOS, L. R B ; SAMPAIO, F.G.; BOJINK, C.Li.; RANTIN, F.T. **Effect of exercise and vitamin C supplementation on the oxidative metabolism of matrinxã..** In: 41th Congress of the Brazilian Physiological Society & Joint Meeting with The Physiological Society, 2006, Ribeirão Preto - SP. Abstracts. São Paulo : Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2006. p. 20.

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

OLLE, C.D. **Efeito do inseticida organofosforado metilparation (FOLISUPER 600BR®) sobre a função cardio-respiratória do peixe teleósteo matrinxã, *Brycon cephalus*.** São Carlos, SP, 2007. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/UFSCar, 120p.

ORCHARD, C.H. **The role of the sarcoplasmic reticulum in the response of ferret and rat heart muscle to acidosis.** *J Physiol.* 384, 431–49, 1987.

ORCHARD, C.H.; KENTISH, J.C. **Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle.** *Am. J. Physiol.* 258, C967–C981, 1990.

ORCHARD, C.H., HAMILTON, D.L., ASTLES, P., MCCALL, E.; JEWELL, B.R. **The effect of acidosis on the relationship between  $\text{Ca}^{2+}$  and force in isolated ferret cardiac muscle.** *J. Physiol.* 436, 559–578, 1991.

PALANDOKEN, H., KOLBOT, B.; HEGDE, M.; HARLEY, W.R.; GORIN, F.A.; NANTZ, M.H. **Amiloride peptide conjugates: prodrugs for sodium-proton exchange inhibition.** *JPET* 312:961–967, 2005

PALTY, R.; OHANA, E.; HERSHFINKEL, M.; VOLOKITA, M.; ELGAZAR, V.; BEHARIER, O.; SILVERMAN, W.F.; ARGAMAN, M.; SEKLER, I. **Lithium-Calcium Exchange Is Mediated by a Distinct Potassium-independent Sodium-Calcium Exchanger.** The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Vol. 279, No. 24, June 11, pp. 25234–25240, 2004

PELOUCH, V.; VORNANEN, M. **Effect of thermal acclimation on ventricle size, protein composition and contractile properties of crucian carp heart.** *J. Therm. Biol.* 1, 1-9, 1996.

PÉREZ, NG, MATTIAZZI, A.; CINGOLANI, H. E. **Role of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in the recovery of contractility during hypercapnia in cat papillary muscles.** *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 101, 107–112, 1993.

PÉREZ NG, MATTIAZZI AR, CAMILIÓN de HURTADO MC, CINGOLANI HE. **Myocardial contractility recovery during hypercapnic acidosis: its dissociation from recovery in pHi by ryanodine.** *Can J Cardiol*;11:553–60, 1995.

PHILIPSON, K.D.; BERSOHN, M.M.; NISHIMOTO, A.Y. **Effects of pH on  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles.** *American Heart Association*, v 50; pp 287-293, 1982.

POOLE-WILSON PA. **Regulation of intracellular pH in the myocardium; relevant to pathology.** *Mol Cell Biochem.* 89, 151–5, 1982.

POOLE, R.C., HALESTRAP, A.P. **Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes.** *Am. J. Physiol.* 264 (33): C761-C782, 1993.

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

RANTIN, F.T.; GESSER, H.; KALININ, A.L.; GUERRA, C.D.R.; FREITAS, J.C. & DRIEDZIC, W.R. **Heart performance,  $\text{Ca}^{2+}$  regulation and energy metabolism at high temperatures in *Bathygobius soporator*, a tropical, marine teleost.** *J. therm. Biol.*, v. 23, n. 1, pp. 31-39, 1998.

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

ROCHA, M.L.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. **Effects of temperature and calcium availability on cardiac contractility in *Synbranchus marmoratus*, a neotropical teleost.** Comparative Biochemistry and Physiology, Grã-Bretanha, v. 146, p. 544-550, 2006.

ROCHA, M.L.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. **Importance of the sarcoplasmic reticulum and adrenergic stimulation on the cardiac contractility of the neotropical teleost *Synbranchus marmoratus* under different thermal conditions.** Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, v. 177, p. 713-721, 2007.

ROMANIN, C.; KARLSSON, J-O & SCHINDLER, H. **Activity of cardiac L-type  $Ca^{2+}$  channels is sensitive to cytoplasm calcium.** *Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.)*, v., 421, pp. 516-518, 1992.

SAINI, H.K.; DHALLA, N.S. **Defective calcium handling in cardiomyocytes isolated from hearts subjected to ischemia-reperfusion.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2260–H2270, 2005.

SALAS, M.A., VILA-PETROF, M. G, VENOSA, R.A, MATTIAZZI, A. **Contractile recovery from acidosis in toad ventricle is independent of intracellular pH and relies upon  $Ca^{2+}$  influx.** *The Journal of Experimental Biology* 209, 916–926, 2006.

SANTER, R.M.; COBB, J.L. **The fine structure of the heart of the teleost, *Pleuronectes platessa* L.** *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 131: 1-14, 1972.

SANTER, R.M. **Morphology and innervation of the fish heart.** *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, v. 89, p. 1-102, 1985.

SHEPHERD, N.; KAVALER, F. **Direct control of contraction force of single frog atrial cells by extracellular ions.** *Am. J. Physiol.*, v. 251, n. 20, pp. C653-C661, 1986.

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

SHIELS, H.A., FARRELL, A.P. **The effects of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing  $Ca^{2+}$  to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout.** *J. Exp. Biol.* v 200, pp. 1607–1621, 1997.

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

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

SHIELS, H.A.; WHITE, E. **Temporal and spatial properties of cellular  $Ca^{2+}$  flux in trout ventricular myocytes.** *Am. J. Physiol.* 288, R1756 -R1766, 2005.

SOLARO, R.J., LEE, J.A., KENTISH, J.C.; ALLEN, D.G. **Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats.** *Circ. Res.* 63, 779-787, 1988.

SUTKO, J.L., AIREY, J.A. **Ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  release channels: does diversity in form equal diversity in function?** *Physiol. Rev.*, v. 76, n. 4, pp. 1027-1071, 1996.

TERRACIANO, C. M.; MACLEOD, K. T. **Effects of acidosis on  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange and consequences for relaxation in guinea pig cardiac myocytes.** *Am. J. Physiol.* 267, H477-H487, 1994.

THOMAS, M.J.; HAMMAN, B.N. & TIBBITS, G.F. **Dihydropyridine and ryanodine binding in ventricles from rat, trout, dogfish and hagfish.** *J. exp. Biol.*, v. 199, pp. 1999-2009, 1996.

THOMAZ, J.M.; MARTINS, N.D.; MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. **Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON).** *Ecotoxicology and environmental safety*;72(5):1413-24, 2009.

TIBBITS, G.F.; KASHIHARA, H.; THOMAS, M.J.; KEEN, J.E. & FARRELL, A.P.  **$Ca^{2+}$  transport in myocardial sarcolemma from rainbow trout.** *Am. J. Physiol.*, v. 259, n. 28, pp. R453-R460, 1990.

TIBBITS, G.F.; HOVE-MADSEN, L. & BERS, D.M. **Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts: a comparison with higher vertebrates.** *Can. J. Zool.*, v. 69, pp. 2014-2019, 1991.

TIBBITS, G.F.; MOYES, C.D. & HOVE-MADSEN, L. **Excitation-contraction coupling in the teleost heart.** In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. & FARRELL, A.P. *Fish Physiology: The Cardiovascular System.* v.12A. New York: Academic Press Inc. pp. 267-303, 1992a.

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

TOTA, B. **Myoarchitecture and vascularization of the elasmobranch heart ventricle.** J. Exp. Zool. (Suppl.), v. 2, p. 122-135, 1989.

TURNER, J.D.; WOOD, C.M. **Factors affecting lactate and proton efflux from pre-exercised,** isolated-perfused rainbow trout proton efflux from pre-exercised, isolated-perfused rainbow trout trunks. J. Exp. BioZ. 105: 395-401, 1983.

ULTSCH, G.R.; JACKSON, D.C. **Long-term submergence at 3°C of the turtle *Chrysemys picta bellii* in normoxic and severely hypoxic water..** J. Exp. Biol. **96**, 11-28, 1982.

VAL, A.L, HONCZARIK, A. **Criando peixes na Amazônia.** Manaus, INPA. 160p, 1995.

VORNANEN, M. **Regulation of contractility of the fish (*Carassius carassius* L.) heart ventricle.** Comp. Biochem. Physiol. C, v. 94, n. 2, pp. 477-483, 1989.

VORNANEN, M., SHEPHERD, N., ISENBERG, G. **Tension-voltage relations of single myocytes reflect Ca release triggered by Na/Ca exchange at 35 °C but not 23 °C.** Am. J. Physiol, v. 267, p. C623-C632, 1994.

VORNANEN, M. **Effects of extracellular calcium on the contractility of warm- and cold-acclimated crucian carp heart.** J. Comp. Physiol. B 166, 1–11. 1996.

VORNANEN, M. **Sarcolemmal Ca influx through L-type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish.** Am. J. Physiol., v. 272, n. 41, pp. R1432-R1440, 1997.

VORNANEN, M. **L-type Ca<sup>2+</sup>-current in fish cardiac myocytes: effects of thermal acclimation and β-adrenergic stimulation.** J. exp. Biol., v. 201, pp. 533-547, 1998.

VORNANEN, M. **Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange current in ventricular myocytes of fish heart: Contribution to sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> influx.** J. Exp. Biol. 202, 1763-1775, 1999.

WANG, Y, HEIGENHAUSER, G.J, WOOD, C.M. **Lactate and metabolic H<sup>+</sup> transport and distribution after exercise in rainbow trout white muscle.** Am J Physiol 271:R1239–R1250, 1996.

WIER, W.G. **Cytoplasmic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in mammalian ventricle: dynamic control by cellular processes.** Annu. Rev. Physiol., v. 52, pp. 467-485, 1990.

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

YUAN, W.; BERS, D.M. **Ca-dependent facilitation of cardiac Ca<sup>2+</sup> current is due to Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase.** Am.J. Physiol. 267, H982–H993, 1994.