

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO – DGE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA



TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO

**ESTUDO SOBRE A ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES CANABINOIDES NA
FUNÇÃO CARDÍACA DE MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*: EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO MANEJO DE CÁLCIO**

Aluna: KARINA CARLA DE FRANCISCO CAMPOS

Orientadora: Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro

São Carlos - SP

JUNHO/2021

Karina Carla de Francisco Campos

**ESTUDO SOBRE A ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES CANABINOIDES NA
FUNÇÃO CARDÍACA DE MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*: EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO MANEJO DE CÁLCIO**

Monografia apresentada ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia sob orientação da Prof^ª Dr^ª Diana Amaral Monteiro.

São Carlos – SP

JUNHO/2021

AGRADECIMENTOS

Não poderia começar diferente se não agradecendo aos meus dois maiores pilares em toda e qualquer conquista: meus avós João Carlos de Francisco e Rosa Aparecida Caborício de Francisco. Nunca soltaram a minha mão ou me deixaram cair, mesmo quando nada parecesse estar no devido lugar. Essas duas pessoas, dois anjos da guarda de pele e osso, me guiam desde antes de eu me reconhecer enquanto gente. Cada bronca e cada palavra amiga me trouxeram até o momento em que escrevo os agradecimentos da defesa da minha tão sonhada graduação. Obrigada por nunca desistirem de mim, por sempre enxergarem aquilo que por certo tempo eu não vi nem a sombra. É para vocês... sempre foi.

Agradeço aos meus irmãos João, Kamila, Kelvin e Rafinha por, talvez sem nem terem ideia da magnitude disso, configurarem uma das minhas maiores motivações. Com cada um de vocês eu aprendi e aprendo lições diferentes. Coisas que pesquisa científica nenhuma seriam capazes de me ensinar. Uma delas – e me arrisco a dizer que a mais importante – é o fato de que o tempo não volta. Aproveito esse espacinho para agradecer à mulher que me deu vocês: Luciana. Mãe, você sempre será um dos meus principais exemplos de revolução. Obrigada por tudo.

Dedico um agradecimento especial à minha orientadora, Diana Amaral Monteiro, por ser a minha principal referência de mulher que faz a ciência acontecer. Espero desenvolver 1/3 do pensamento científico e da didática que você possui. Sei que falo por muitos quando digo que as aulas de FAC1 salvavam as quintas-feiras. Obrigada por sempre tentar extrair de mim meu melhor desempenho, por toda a paciência, por me incentivar e me conduzir até aqui desde 2018. Se não fosse você e as tantas conversas que tivemos, eu teria perdido muito mais.

Aos amigos que adquiri durante a minha breve história, obrigada por cada risada, por cada momento de ócio criativo, cada choro em conjunto, cada abraço (tão escassos no cenário atual) e cada momento compartilhado. Vocês são incríveis. Os melhores. Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE-C – Acoplamento Excitação-Contração

AMPC – Monofosfato cíclico de adenosina

$[Ca^{2+}]_i$ – Concentração de cálcio intracelular

CB1 – Receptor Canabinoide 1

CB2 – Receptor Canabinoide 2

LTCC – Canal de cálcio tipo Lento

MPKA – Proteínas quinases ativadas por motógenos

NCX – Trocador Sódio-Cálcio

PKA – Proteína quinase A

PLB – Fosfolambam

PLC – Proteína fosfolipase C

RS – Retículo Sarcoplasmático

RyR – Receptor de Rianodina

SEC – Sistema Endocanabinoide

SERCA – Ca^{2+} -ATase do retículo sarcoplasmático

SN – Sistema Nervoso

SNA – Sistema Nervoso Autonomo

THC – Delta-9-tetrahidrocanabidiol

TnC – Troponina C

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** esquema do AE-C cardíaco evidenciando a movimentação do cálcio e a atuação das proteínas NCX, PLB e SERCA, além de outras estruturas cruciais para a contração e o relaxamento dos cardiomiócitos.....12
- Figura 2:** Estrutura molecular dos canabinoides sintéticos utilizados no presente estudo; **A** HU 308 e **B** WIN 55 212-2.....17
- Figura 3:** Densidade óptica, em unidades arbitrárias (U.A.), da expressão da proteína SERCA no ventrículo de matrinxã, *Brycon amazonicus*, dos grupos Ct (n=10), WIN (n=10) e HU (n=10).....23
- Figura 4:** Densidade óptica, em unidades arbitrárias (U.A.), da expressão da proteína PLB no ventrículo de matrinxã, *Brycon amazonicus*, dos grupos Ct (n=10), WIN (n=10) e HU (n=10).....25
- Figura 5:** Gráfico relativo aos dados obtidos para a razão PLB/SERCA dos grupos Ct, WIN e HU.....26
- Figura 6:** Densidade óptica, em unidades arbitrárias (U.A.), da expressão da proteína NCX no ventrículo de matrinxã, *Brycon amazonicus*, dos grupos Ct (n=10), WIN (n=10) e HU (n=10). Nos grupos teste estão dados totais da expressão das duas isoformas e dados de cada uma delas isoladamente.....27
- Figura 7:** Gráfico relativo aos dados obtidos para a razão NCX/SERCA dos grupos Ct, WIN e HU.....28

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ativação dos receptores CB1 e CB2 na expressão das proteínas envolvidas no manejo de cálcio do miocárdio do peixe tropical matrinxã, *Brycon amazonicus*. Foram empregados três grupos experimentais: controle, tratado com o veículo (DMSO 2,5% em soro fisiológico com gota de Tween-20) e grupos WIN e HU, ambos tratados com dose única (1 mg.kg^{-1}) de canabinóides sintéticos WIN 55 212-2 (não específico) e HU 308 (específico para CB2), respectivamente, diluídos em veículo. Após 24 horas, os ventrículos ($n = 10$) foram coletados de cada grupo experimental e, após extração das proteínas totais, foi realizada a análise da expressão da Ca^{2+} -ATPase do Retículo Sarcoplasmático (SERCA), do trocador sódio/cálcio (NCX) e do fosfolambam (PLB) utilizando a técnica de biologia molecular *Western Blotting*. Foram detectados aumentos ($p < 0,05$) na expressão de PLB e NCX nos grupos WIN e HU e houve aumento significativo na expressão de SERCA apenas no grupo HU. Assim, a ativação dos receptores canabinóides CB1 e CB2 pode desempenhar um papel importante na função cardíaca, regulando positivamente os níveis de proteínas responsáveis pelo manejo de cálcio.

Palavras-chave: Sistema endocanabinoide. Expressão de proteínas do tecido cardíaco. Manejo de cálcio. Acoplamento excitação-contração. Agonistas canabinóides.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of activation of CB1 and CB2 receptors on proteins involved in myocardial calcium handling of the tropical fish matrinxã, *Brycon amazonicus*. Three experimental groups were employed: control, treated with the vehicle (DMSO 2.5% in saline with a drop of Tween-20) and WIN and HU groups, both treated with a single dose (1 mg·kg⁻¹) of cannabinoids synthetic WIN 55 212-2 (non-specific) and HU 308 (specific for CB2), respectively, dissolved in vehicle. After 24 hours, the ventricles (n = 10) were collected from each experimental group and, after total proteins extraction, analysis of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA), sodium/calcium exchanger (NCX) and phospholamban (PLB) expressions were carried out using the molecular biology technique Western Blotting. Increases were detected (p<0.05) in the expression of PLB and NCX in WIN and HU groups and there was a significant increase in SERCA expression only in the HU group. Therefore, activation of cannabinoid receptors CB1 and CB2 can play an important role in cardiac function, positively regulating the levels of calcium handling proteins.

Keywords: Endocannabinoid system. Cardiac proteins expression. Calcium handling. Excitation-contraction coupling. Cannabinoid agonists.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Efeitos do SEC no Sistema Cardiovascular.....	9
1.2 Acoplamento Excitação-Contração (AE-C) Cardíaco.....	11
1.3 Papel das proteínas SERCA, NCX e PLB no AE-C.....	13
1.4 Organismo modelo do presente estudo.....	15
1.5 Canabinoides utilizados no presente estudo.....	16
1.6 Justificativa.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Delineamento Experimental.....	19
3.2 Análise da expressão de proteínas envolvidas no manejo de Ca ²⁺	20
3.3 Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÕES.....	29
6. REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a World Health Organization (WHO, 2019), as doenças cardiovasculares ocupam a primeira posição no ranking mundial de doenças que mais tiram vidas todos os anos com um número de mortes estimado em 17,9 milhões por ano. De maneira geral, patologias desta natureza estão relacionadas a desordens metabólicas, hábitos alimentares, fatores genéticos e estilo de vida – consumo de álcool, tabagismo e hipertensão são alguns fatores em comum apresentados por diversas vítimas de patologias cardiovasculares (RUAN et al., 2018).

O sistema cardiovascular está intimamente relacionado a diversos fatores e é regulado por outros tantos sistemas. O Sistema Nervoso Autônomo (SNA), por exemplo, modula o fluxo sanguíneo e, por consequência, a pressão arterial (DAMPNEY et al., 2002), além de modular a força de contração cardíaca (FLORAS, 2012). Adicionalmente, a regulação hormonal desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do sistema cardiovascular tanto em vertebrados aquáticos quanto em tetrápodes e bípedes (TAKEI; OGOSHI; INOUE, 2007). A liberação de epinefrina pelas adrenais amplifica as respostas do SNA simpático sobre a frequência cardíaca e força de contração, enquanto que a liberação de vasopressina (ADH, hormônio anti-diurético) e a ação do sistema renina-angiotensina estão associadas à regulação da pressão arterial (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015).

Outro sistema responsável pela regulação do sistema cardiovascular, cuja função não está totalmente esclarecida, é o denominado Sistema Endocanabinóide (SEC) (DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2009). Importante para a regulação de órgãos e tecidos, o SEC foi identificado no final dos anos 1990 decorrente de estudos envolvendo o principal composto psicoativo natural derivado da planta *Cannabis sativa*: o delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) (DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2009). Estudos destinados à compreensão da susceptibilidade do SNC a esta substância propiciaram a identificação de receptores capazes de reconhecê-la e de desencadear eventos biológicos, inclusive no tecido cardíaco (HINE; TORRELIO; GERSHON, 1977), os quais ainda permanecem controversos e não compreendidos, com poucos estudos explorando o papel do SEC no sistema cardiovascular, sobretudo na função contrátil.

Os receptores canabinoides foram denominados CB1 e CB2 e encontram-se distribuídos de maneira distinta entre os tecidos e órgãos animais, ajudando a explicar a capacidade que os canabinoides possuem de induzir efeitos psicoativos, antioxidantes, anti-inflamatórios, analgésicos e depressores (JOSHI; ONAIVI, 2019; PERTWEE, 2012). Receptores CB1, por

exemplo, têm sido identificados majoritariamente na região do encéfalo, enquanto que receptores CB2 são mais encontrados nos tecidos periféricos e em células do sistema imunológico (COSTA; GARCIA; CORREA, 2018).

A partir do início do século XXI, um novo termo foi atribuído para que esse sistema incluísse mediadores semelhantes aos endocanabinoides capazes de ativar receptores além dos já bem estabelecidos receptores CB1 e CB2 (ARTURO; FABIANA, 2018). Nessa nova abordagem, recebeu o nome de Endocanabinoidoma, com o 2-araquidonil-glicerol-éter (noladina, 2-AGE), a O-araquidonil-etanolamina (virodamina, OAE), a N-araquidonil-dopamina (NADA) e a amida do ácido oleico, representando alguns de seus ligantes recém-descobertos (oleamida, OA) (ARTURO; FABIANA, 2018; JOSHI; ONAIVI, 2019). Também foram incluídos como receptores-alvo aqueles acoplados à proteína G 55 (FULMER; THEWKE, 2018) e 119 (GPR55 e GPR19), receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma (PPARs) e receptores vanilóides de potencial transitório 1 (TRPV1) (IANNOTTI; DI MARZO; PETROSINO, 2016).

Com o aprofundamento dos estudos acerca dos novos ligantes e receptores, vias inteiras de biossíntese, regulação e degradação foram consideradas parte do Endocanabinoidoma (ARTURO; FABIANA, 2018). Isso amplia não somente o número de componentes integrantes do sistema como também a gama de eventos metabólicos nos quais ele pode influenciar. A busca pelo entendimento de doenças já vem retratando que o SEC exerce um papel importante na determinação da saúde corporal. Esta constatação abre espaço para a pesquisa científica aprofundada dos componentes que o caracterizam (MUCCIOLI, 2010), uma vez que o conhecimento concreto deste sistema pode ajudar a preencher lacunas encontradas na descrição da fisiopatologias de doenças e condições metabólicas, tal como cardiopatias, neuropatias, obesidade e diabetes (KASCHINA, 2016).

Vale acrescentar que a presença do SEC, em diferentes graus de complexidade, organização e discriminação, já foi constatada desde os mamíferos até filos mais primitivos, tal como Cnidaria (SILVER, 2019). A distribuição dos dois principais receptores, CB1 e CB2, corroborou com o padrão já descrito: CB1 mais presente em componentes no Sistema Nervoso (SN), enquanto CB2 é mais encontrado em órgãos e tecidos periféricos, além dos componentes do sistema imune.

No tecido cardíaco humano a distribuição de receptores canabinoides tem mostrado dependência tanto com relação ao sexo quanto com relação à idade (PIOTROWSKA et al., 2018), além das constatações já apresentadas sobre a prevalência de um ou de outro

influenciada pelos hábitos alimentares ou pela localização e função do tecido. Em peixes, as informações sobre a influência de canabinoides ou a abundância de receptores ainda é escassa.

Em 1996, um estudo realizado constatou a presença de genes que possuem alta homologia com os que codificam os receptores canabinoides CB1 em humanos no peixe *Fugu rubripes* e baixa homologia entre os genes identificados até o momento envolvidos na expressão do CB2 (YAMAGUCHI; MACRAE; BRENNER), confirmando a presença de um possível sistema endocanabinoide na espécie. A identificação de receptores CB2 aconteceu somente após o sequenciamento do DNA de *Fugu rubripes* (ELPHICK, 2002), disponível na plataforma BLAST, com o levantamento de um possível gene codificador, sendo o primeiro vertebrado não-mamífero estudado a portar um gene com algumas similaridades com os conhecidos para CB2.

Posteriormente, receptores CB1 foram descritos em abundância no tecido cerebral de peixes da espécie *Pelvicachromis pulcher* (COTTONE et al., 2005), um teleósteo africano; e em 2007, um estudo publicado trouxe evidências de receptores CB2 encontrados em amostras de diferentes tecidos do peixe-paulistinha, *Danio rerio* (RODRIGUEZ-MARTIN et al., 2007) a partir da identificação de mRNA de dois possíveis genes (cb2a e cb2b) do receptor. Dentre as amostras estudadas estavam tecidos cerebral, cardíaco, muscular e intestinal. Utilizando a técnica de RTq-PCR, o RNA total de cada tecido foi extraído, purificado e amplificado com primers específicos para cada um dos dois possíveis mRNAs codificadores de CB2 (Cb2a e Cb2b). Com exceção do cerebral e do muscular, que apresentaram apenas Cb2b, a amplificação foi positiva para ambos os genes em todos os tecidos, incluindo o cardíaco, comprovando a presença de precursores de CB2 nesse tecido de peixes.

1.1 Efeitos do SEC no Sistema Cardiovascular

Anteriormente acreditava-se que todos os efeitos observados no sistema cardiovascular com a administração de canabinoides se dava indiretamente, via ativação de receptores no encéfalo gerando respostas no coração (KASCHINA, 2016). Entretanto, graças às pesquisas realizadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, utilizando modelos animais ou seus tecidos, foi constatado que canabinoides podem modular receptores (JOSHI; ONAIVI, 2019) identificados no coração de inúmeros vertebrados (SILVER, 2019).

Diversos estudos foram conduzidos acerca do comportamento de componentes do SEC em situações de injúrias metabólicas e cardiopatias. Já se tem conhecimento de que os níveis de endocanabinoides endógenos e dos principais receptores desse sistema, CB1 e CB2,

apresentam variações em ratos e cobaias, nos quais foram induzidas injúrias no tecido cardíaco em comparação aos seus respectivos grupos controle (KASCHINA, 2016). Ambas as abordagens de pesquisa, seja interferindo localmente no tecido cardiovascular ou analisando sua resposta à algum evento sistêmico de origem fisiopatológica, corroboram com o importante fato de que, bem como em muitos tecidos, o coração sofre influência, e possivelmente regulação, do SEC, reagindo direta e/ou indiretamente aos níveis de canabinoides sintéticos, naturais e endógenos presentes.

Dentre os efeitos da ativação do SEC observados em ensaios com diferentes animais modelo, podem ser citados hipotensão, arritmia, bradicardia e efeitos vasodilatadores das artérias coronárias (DI MARZO, 2006; MONTECUCCO; DI MARZO, 2012). Todos esses eventos foram atribuídos à ativação do CB1, indicando a importância desse receptor para a indução de respostas cardíacas frente a desafios. Em camundongos nocauteados para o gene que codifica o CB1, por exemplo, a taxa de mortalidade aumentou, principalmente quando era induzida uma constrição transversal da aorta, levando tanto à morte por insuficiência cardíaca aguda e crônica quanto ao prejuízo dos parâmetros cardíacos em comparação à linhagem selvagem (KASCHINA, 2016). Isso indica que o CB1 talvez esteja envolvido na proteção deste tecido, além de influenciar nos aspectos previamente mencionados.

Estudos utilizando linhagens modelo de roedores para infarto do miocárdio agudo e crônico trouxeram resultados conflitantes. A administração do antagonista específico para CB1 AM251 em ensaios de falência cardíaca crônica demonstraram promover remodelamento cardíaco ao mesmo tempo que aumentou a sobrevivência. Os testes com o agonista para o mesmo receptor, HU 210, indicaram que houve prevenção da disfunção endotelial no tecido cardíaco, porém com um aumento na pressão ventricular (MUKHOPADHYAY et al., 2008).

Ao analisar os efeitos no coração de camundongos nocauteados para o gene que codifica receptores CB2 ($Cnr2^{-/-}$) após repetidos ensaios de isquemia e reperfusão pelo método de Langendorff, ecocardiogramas, ensaios histológicos e de biologia molecular demonstraram um efeito cardioprotetor dependente do receptor em questão. Os exemplares $Cnr2^{-/-}$, além de apresentarem uma acentuada perda de cardiomiócitos em comparação à linhagem normal, retrataram disfunção ventricular e fibrose, com prejuízo irreversível no remodelamento do tecido cardíaco (DUERR et al., 2014).

A elevação da concentração de endocanabinoides local e/ou sistêmica parece estar fortemente associada a quadros de aterosclerose, sugerindo que estes podem ser fatores de risco

ou biomarcadores de doenças vasculares em progressão (FULMER; THEWKE, 2018). Os primeiros indícios de que o receptor CB2 desempenhava algum papel em ateroscleromas vieram de estudos conduzidos por Steffens et al. em 2005 nos quais camundongos ApoE^{-/-} recebendo baixas doses de THC desenvolveram placas significativamente menores e com menos sinais de inflamação que o grupo controle. Ao realizarem a co-administração do THC e do antagonista específico para CB2, SR144528, notaram que o tamanho e a quantidade de macrófagos presentes nas placas do grupo teste se igualaram aos encontrados no grupo controle, revelando um efeito anti-aterosclerótico em potencial atribuído aos receptores CB2 (FULMER; THEWKE, 2018; MACH; MONTECUCCO; STEFFENS, 2008; STEFFENS et al., 2005). Em camundongos, a ativação direta do receptor CB2 pelo agonista seletivo JWH-133 durante a isquemia cardíaca também reduziu o tamanho do infarto e evitou a apoptose (MONTECUCCO et al., 2009).

De maneira geral, o que tem sido observado com relação à atuação do SEC nos organismos no que diz respeito ao sistema cardiovascular é que, em indivíduos saudáveis, a regulação via receptores e canabinoides endógenos aparenta ter um papel limitado; sua atividade intensificada vem sendo relatada em situações de injúrias e na presença de doenças, influenciando na pressão sanguínea e no desempenho contrátil do coração (MUKHOPADHYAY et al., 2008). Assim, acompanhar os efeitos diretos e indiretos modulados pelo SEC podem ajudar na compreensão da fisiopatologia de doenças, inclusive as cardiovasculares, desde seu início até sua progressão, tratamento ou cura.

1.2 Acoplamento Excitação-Contração (AE-C) Cardíaco

O AE-C cardíaco (Figura 1) corresponde aos eventos que vão desde a excitação elétrica da membrana superficial (potencial de ação) até a contração, culminando com a sístole e o consequente bombeamento sanguíneo para fora do ventrículo (EISNER et al., 2017). A contratilidade cardíaca é regulada por mudanças na concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$). O funcionamento do coração enquanto bomba requer que a $[Ca^{2+}]_i$ seja suficientemente alta na sístole e baixa na diástole.

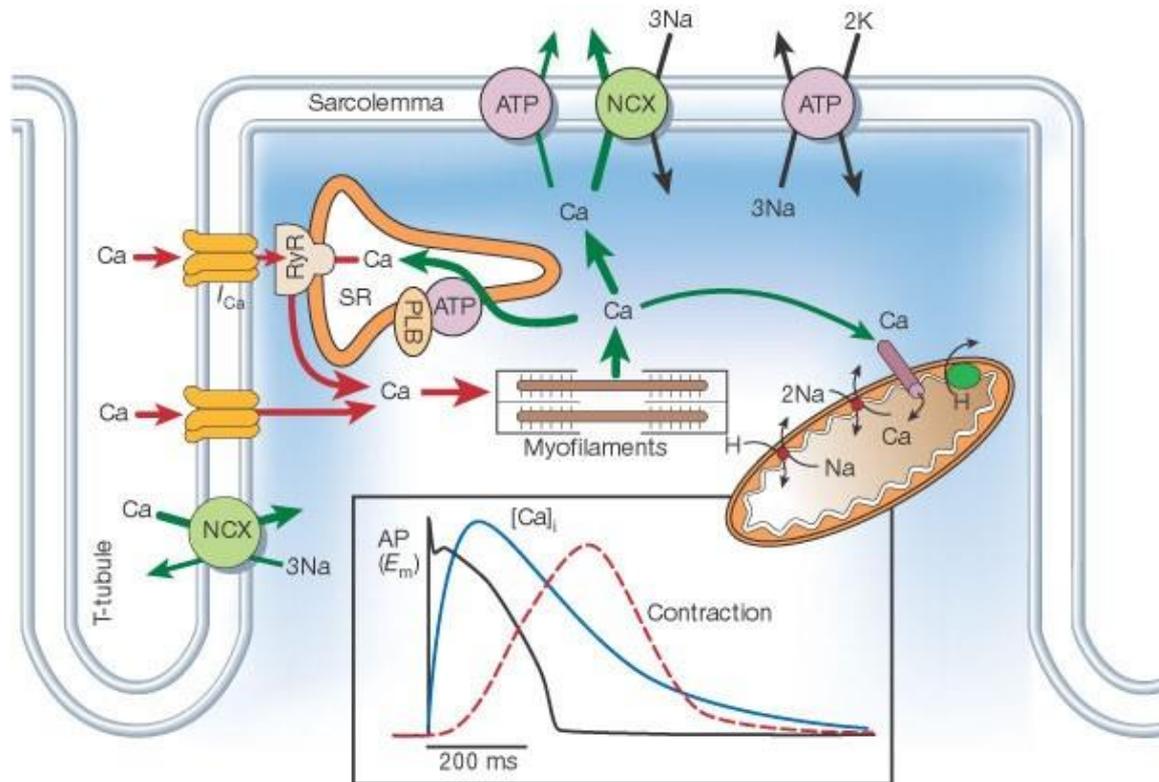


Figura 1: esquema do AE-C cardíaco evidenciando a movimentação do cálcio e a atuação das proteínas NCX, PLB e SERCA, além de outras estruturas cruciais para a contração e o relaxamento dos cardiomiócitos. Fonte: BERS, 2002.

A despolarização da membrana leva à abertura de canais de cálcio lentos ativados por voltagem (Ca^{2+} Tipo-L ou LTCC). Esse influxo de cálcio permite tanto a configuração do platô característico do potencial de ação cardíaco quanto a ativação de receptores de rianodina (RyR) presentes no retículo endoplasmático das células musculares, também chamado de Retículo Sarcoplasmático (RS), liberando o Ca^{2+} armazenado e aumentando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esse aumento induz o deslocamento do complexo troponina e tropomiosina pela ligação do íon à subunidade TnC, o que resulta em alteração conformacional do complexo e exposição dos sítios de ligação à cabeça miosina presentes nos filamentos de actina (SZCZESNA et al., 2000).

Os eventos seguintes levam ao deslizamento dos filamentos grossos de miosina sobre os filamentos finos de actina, encurtando a subunidade contrátil da miofibrila, o sarcômero. A contração dos sarcômeros e, conseqüentemente, dos cardiomiócitos unidos por junções *gap*, junções aderentes e desmossomos, determinam o comportamento de bloco contrátil do coração ao bombear o sangue dos ventrículos para as artérias e dos átrios para os ventrículos.

Após a sístole, para que o relaxamento aconteça, outras três proteínas exercem um papel fundamental na redução da $[Ca^{2+}]$ citosólica: o NCX, a SERCA e o PLB. O Ca^{2+} é removido do citosol por recaptação pela Ca^{2+} -ATPase sarcolemal, a SERCA, cuja atividade é regulada pela PLB, e pelo fluxo transsarcolemal de Ca^{2+} que leva o íon para fora das fibras, realizado pelo trocador Na^+ - Ca^{2+} (NCX) (EISNER et al., 2017). Com a baixa $[Ca^{2+}]_i$ os cardiomiócitos entram em diástole.

1.3 Papel das proteínas SERCA, NCX e PLB no AE-C

A SERCA é uma bomba localizada na membrana que envolve o retículo endoplasmático de células musculares. É uma proteína de aproximadamente 110 kDa que, em humanos, admite 994 aminoácidos em uma cadeia única (XU et al., 2002), cuja função é coordenar a entrada de Ca^{2+} no RS, desempenhando um papel crucial na remoção do Ca^{2+} transiente. Sua atividade é dependente de ATP (GORSKI; CEHOLSKI; YOUNG, 2017), ou seja, demanda gasto energético para funcionar como uma bomba de Ca^{2+} trabalhando contra um gradiente de concentração (XU et al., 2002). A transferência de um grupamento fosfato terminal do ATP para um resíduo de aspartato no sítio catalítico (AHO; VORNANEN, 1998) induz alterações conformacionais necessárias para a entrada do Ca^{2+} , associando a hidrólise do ATP ao transporte do íon.

Devido ao RS ser o mais importante armazenador de Ca^{2+} intracelular tanto em célula muscular esquelética quanto em cardiomiócitos na maior parte dos vertebrados superiores e a SERCA atuar na reposição do gradiente deste íon no retículo para a próxima contração (BERS, 2002), a proteína se relaciona diretamente com o evento de relaxamento muscular. Sua atuação é regulada, principalmente, pela PLB, uma proteína transmembrana localizada próxima a bomba na membrana do RS. Apesar de já estar bem estabelecido que a atividade e a expressão da proteína PLB variam de acordo com a espécie e a dinâmica cardíaca entre os diferentes grupos de animais (SIMMERMAN; JONES, 1998), além do fato de ter sido sequenciada em diversos organismos, desde anfíbios e peixes até abundantemente em mamíferos (CERRA; IMBROGNO, 2012), quando presente, desempenha um papel importante no AE-C.

Em vertebrados, a SERCA encontra-se inibida pela PLB (GORSKI; CEHOLSKI; YOUNG, 2017), mecanismo que impede que o Ca^{2+} retorne ao RS antes que o miócito ou cardiomiócito consiga se contrair. Esta inibição deve ser impedida para que a SERCA

desempenhe seu papel, enviando Ca^{2+} para o interior do retículo. Quando o nível de Ca^{2+} transiente está baixo, durante a diástole, o monômero PLB interage com a SERCA inibindo a atividade da bomba ao diminuir a afinidade da mesma pelo Ca^{2+} . Essa situação permanece até que o Ca^{2+} sistólico alcance seu nível limite para reativar a bomba (PERIASAMY; BHUPATHY; BABU, 2008). A proteína quinase A (PKA) ativa também é capaz de liberar a SERCA da inibição do PLB realizando, no segundo, uma fosforilação. Com a adição do grupo fosfato a PLB sofre alterações conformacionais perdendo afinidade pela SERCA, liberando seus domínios de ligação (GORSKI; CEHOLSKI; YOUNG, 2017; SIMMERMAN; JONES, 1998).

Dessa forma, a taxa de recaptação de Ca^{2+} pela SERCA pode ser controlada pelo grau de fosforilação do PLB. O aumento da estimulação β -adrenérgica, por exemplo, reduz a associação entre SERCA e PLB ao estimular vias de transdução que ativam a PKA, o que, consequentemente, aumenta a fosforilação do PLB (BERS, 2002). Também há uma correlação muito próxima entre a taxa de captação do Ca^{2+} e a proporção entre PLB e SERCA, sendo um importante determinante da contratilidade cardíaca (FRANK; KRANIAS, 2000). Um aumento na razão PLB/SERCA resulta na inibição máxima da bomba SERCA culminando na redução da contratilidade e desenvolvimento de hipertrofia cardíacas, enquanto uma redução na razão está relacionada a um aumento da captação e do armazenamento de Ca^{2+} e elevações nas taxas de contração e relaxamento sem patologias associadas (PERIASAMY; BHUPATHY; BABU, 2007).

A ciclagem do Ca^{2+} depende, também, do NCX (HILGEMANN, 1990), um componente de uma superfamília de proteínas de membrana especializadas em transporte de íons (PHILIPSON et al., 2006) que pode tanto dar suporte ao influxo de Ca^{2+} quando sob efeito de potenciais de membrana que culminam na sístole, quanto auxiliar no efluxo de Ca^{2+} durante a diástole (REPPPEL et al., 2007). A proteína apresenta não somente a função de auxiliar a SERCA na redução da concentração de Ca^{2+} intracelular como pode promover seu influxo (TOTH et al., 2009), dependendo do cenário no qual se encontra o cardiomiócito. Dependendo da espécie, o papel do NCX na remoção do Ca^{2+} citosólico é maior que o da SERCA. Uma das principais regulações da atividade do trocador é a concentração de Na^+ citosólica (HILGEMANN, 2020), que, quando elevada, pode favorecer o influxo de Ca^{2+} . Além disso, o NCX possui um domínio de cerca de 550 aminoácidos susceptível à regulação de mensageiros citoplasmáticos, pelo próprio Ca^{2+} e por proteínas quinases específicas, sendo sítio de atuação de alguns fármacos

(TOTH et al., 2009). A fosforilação do NCX devido à estimulação β -adrenérgica é capaz de acelerar o relaxamento cardíaco (HAN; FERRIER, 1995).

De maneira bem mais acentuada que nos mamíferos, o NCX é um fator importante no relaxamento dos cardiomiócitos ventriculares de peixes, uma vez que contribui significativamente para a extrusão de Ca^{2+} (HAUSTEIN et al., 2015). A mutação no NCX1 causa fibrilação cardíaca em peixes zebra, ao causar um desequilíbrio do Ca^{2+} citosólico nos cardiomiócitos, que então desencadeia a liberação espontânea de Ca^{2+} do RS independente da despolarização da membrana levando à fibrilação cardíaca em mutantes (LANGENBACHER et al., 2005). Quando um miócito de peixe está se contraindo em um estado estacionário, o Ca^{2+} que entra na célula através da sarcolema a cada batida se move de volta através da mesma pela ação do NCX. Como a ciclagem transsarcolemal de Ca^{2+} é mais proeminente do que a ciclagem de Ca^{2+} no RS no coração de várias espécies de peixe, a SERCA contribui menos para o relaxamento em comparação ao que ocorre no coração dos mamíferos. No entanto, se a SERCA for inibida, ela retardará a queda do transiente Ca^{2+} e o relaxamento do miócito do peixe, num processo semelhante ao que é observado nos cardiomiócitos de mamíferos neonatos (SHIELS, 2017). Parece que a diferença entre peixes ou recém-nascidos e o RS dos mamíferos adultos reside na capacidade de liberar Ca^{2+} , ao invés de sequestrá-lo (SHIELS; GALLI, 2014).

1.4 Organismo modelo do presente estudo

Por mais que os peixes possuam coração miogênico tal como os mamíferos, as diferenças entre o tecido cardíaco e o aparato contrátil dos peixes quando comparados aos humanos, tal como a disponibilidade de cálcio e o número de câmaras cardíacas (dois átrios e dois ventrículos em humanos e um de cada nos peixes (RANDALL, 1968)), pedem cautela na escolha do organismo-modelo a ser utilizado. Embora a contratilidade e o manejo de cálcio sejam mediados por proteínas que apresentam forte homologia (MARSHALL et al., 2005) com as expressas em miócitos de mamíferos e cobaias, como em ratos e camundongos, os peixes, dependendo da espécie, podem ou não ter retículo sarcoplasmático funcional (AHO; VORNANEN, 1998) sendo o cálcio extracelular determinante para o funcionamento dos miócitos e dos eventos responsáveis pela contração.

No caso do peixe paulistinha (*Danio rerio*), por exemplo, apesar de ter apresentado um potencial modelo promissor e possuir mais de 70% de semelhança com o genoma humano (BRADFORD et al., 2017), a entrada do cálcio utilizada na contração do músculo cardíaco

acontece majoritariamente (80%) pelo influxo transsarcolemal (BOVO et al., 2013). Apesar da relação força/frequência negativa característica de vertebrados basais (MONTEIRO et al., 2017), a regulação da força contrátil no miocárdio ventricular do *Brycon amazonicus* (matrinxã) depende fortemente do Ca^{2+} extracelular e, portanto, do influxo de Ca^{2+} transsarcolemal, da extrusão de Ca^{2+} conduzida por NCX e da liberação de Ca^{2+} do RS, sendo que este último contribui com cerca de 70-80 % da ciclagem do cálcio, contribuição essa semelhante àquela observada nos cardiomiócitos de coelhos e cobaias (MONTEIRO et al., 2017; RISSOLI et al., 2017). Tais características tornam a espécie um organismo modelo interessante ao exibir um aparato contrátil mais semelhante ao dos mamíferos que o peixe paulistinha - em ratos, 92% do fornecimento de cálcio provém do retículo (MONTEIRO et al., 2016) - justificando a escolha deste enquanto modelo para o presente estudo.

Não somente devido às características vantajosas do matrinxã acerca de semelhanças com o funcionamento do tecido cardíaco humano comparadas a outros modelos, a utilização de vertebrados basais na pesquisa básica torna-se interessante a medida que atende às diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016), que estabelece os procedimentos e regulamenta as responsabilidades do pesquisador no que diz respeito à experimentação animal e seu papel na triagem clínica. Neste cenário, cabe ressaltar a importância da implementação da política dos 3Rs no meio científico, garantindo cautela no manejo de animais de laboratório. Essa política preza a substituição do uso quando possível e a redução da quantidade e o refinamento dos procedimentos sempre, enaltecendo a importância da ética e das boas práticas envolvendo a manipulação de animais na pesquisa.

1.5 Canabinoides utilizados no presente estudo

O canabinoide sintético HU 308 (Figura 2A) é caracterizado por ser um agonista específico de receptores CB2 (HANUS et al., 1999). A ação do HU 308 e seus similares ativando receptores CB2 tem demonstrado que agonistas canabinoides podem desempenhar um papel relevante em eventos inflamatórios de diversas naturezas, interferindo em componentes cruciais do sistema imune (SMOUM et al., 2015). Efeitos na saúde mental, no comportamento alimentar, no comportamento reprodutivo e até mesmo na regulação da função cardiovascular vem sendo descritos em estudos abordando diversos organismos-modelo (PIOTROWSKA et al., 2018).

Outro canabinoide que vem sendo demasiadamente abordado e que foi selecionado para este estudo é o WIN 55 212-2 (Figura 2B), um agonista não seletivo de receptores canabinoides CB1 e CB2. Justamente por não ser um modulador específico de CB1 ou CB2, sua aplicação tende a trazer informações sobre efeitos mais generalizados atribuídos ao SEC (AN; PEIGNEUR; TYTGAT, 2021).

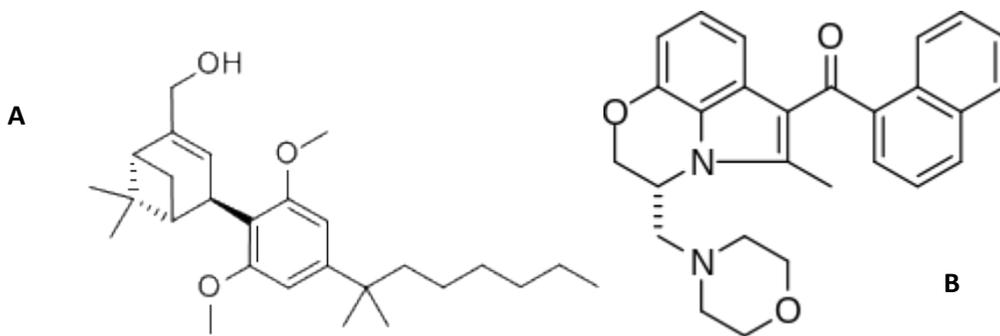


Figura 2: Estrutura molecular dos canabinoides sintéticos utilizados no presente estudo; **A** HU 308 e **B** WIN 55 212-2.

Os canabinoides, sejam eles sintéticos ou não, podem induzir efeitos hipotensivos e bradicárdicos, bem como influenciar a ação contrátil do coração. A estimulação do receptor CB1 resulta no enfraquecimento da contratilidade dos cardiomiócitos, enquanto a ativação do receptor CB2 aumenta a força de contração das células musculares cardíacas de ratos Wistar (STERIN-BORDA; DEL ZAR; BORDA, 2005). Uma vez identificados impactos na contratilidade do músculo cardíaco, torna-se premente mais estudos sobre o papel dos canabinóides no AE-C, além da análise das principais proteínas envolvidas no manejo de Ca²⁺ cardíaco para entender de que maneira e até que ponto o desempenho dos cardiomiócitos é influenciado pela ativação dos receptores canabinoides.

Dessa forma, a modulação do sistema endocanabinoide por agonistas ou antagonistas seletivos, sintéticos ou naturais, pode ter um promissor potencial terapêutico em vários distúrbios cardiovasculares associados à inflamação e lesão tecidual, variando de infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca a aterosclerose e distúrbios cardiometabólicos (PACHER & STEFFENS, 2009).

1.6 Justificativa

Tendo em vista a relevância das cardiopatias no cenário global, a busca por alternativas na prevenção e tratamento das mesmas se faz necessária. Dentre os territórios ainda

incompreendidos da fisiologia está o SEC e sua real influência na regulação da função cardíaca. A presença de receptores canabinóides não apenas em vertebrados superiores, como em diversos grupos animais desde invertebrados, distribuídos de maneira desigual, sugere que o SEC se fez necessário nos organismos no decorrer da evolução. Assim, conhecer e entender suas funções em cada um deles carrega o potencial de descrever processos evolutivos ainda inexplorados.

Haja vista a complexidade de mamíferos no que diz respeito à perfeita compreensão da fisiopatologia das doenças de maior impacto, estudar organismos, distantes ou não evolutivamente, que permitam uma aproximação em direção ao conhecimento de mecanismos regulados pelo SEC, pode fornecer subsídios para abordagens e aplicações futuras. Os indícios disponíveis na literatura, apesar de ainda não estarem completamente elucidados, permitem afirmar que conhecer com profundidade os protagonistas do SEC e suas respectivas vias de atuação pode ser disruptivo na prevenção e tratamento de cardiopatias, estabelecidas mundialmente enquanto as que mais matam nos últimos 20 anos (WHO, 2020).

Muitas descobertas importantes sobre canabinóides foram realizadas, mas muitos mitos e incertezas ainda persistem. A maior parte das interações estudadas entre estes compostos canabinóides endógenos e xenobióticos e seus alvos ocorrem *in vitro* e sua relevância para a farmacologia *in vivo* ainda está longe de ser totalmente estabelecida. É evidente, portanto, que muito trabalho ainda precisa ser feito para examinar a importância farmacológica dos canabinóides e, assim, avaliar plenamente sua promissora relevância biológica/terapêutica.

Apesar dos estudos continuarem progredindo com diferentes abordagens, não são muitos aqueles que relacionam explicitamente o estudo do SEC sobre as proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração (AE-C) cardíaco, tanto no que diz respeito ao quadro de expressão quanto no âmbito de controle e regulação. Diante da revisão da literatura realizada, hipotetizamos que a ativação de receptores canabinóides pode gerar efeitos na expressão de proteínas cruciais para o manejo de cálcio cardíaco utilizando, como modelo experimental, o peixe matrinxã (*Brycon amazonicus*).

Os resultados deste estudo contribuirão para a compreensão dos efeitos da ativação das vias de sinalização dos canabinóides, por manipulação farmacológica dos receptores CB1 e CB2, na função cardíaca, auxiliando a elucidar o papel das vias de sinalização dos canabinóides nas respostas contráteis. Tais subsídios podem colaborar para o desenvolvimento de novos estudos sobre as possíveis aplicações do SEC como um alvo promissor para novas intervenções terapêuticas.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da ativação dos receptores canabinoides CB1+ CB2 e CB2, utilizando os agonistas sintéticos WIN 55 212-2 e HU 308, sobre a expressão das proteínas envolvidas no manejo de Ca^{2+} durante o acoplamento excitação-contracção cardíaco em matrinxã, *Brycon amazonicus*, animal usado como modelo experimental e que se apresenta como ferramenta atrativa para o teste com terapias inovadoras.

Os objetivos específicos do projeto referem-se a:

- Avaliar a expressão da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), no ventrículo de peixes dos grupos controle, WIN e HU.
- Avaliar a expressão do fosfolambam PLB no ventrículo de peixes dos grupos controle, WIN e HU.
- Avaliar a expressão do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX1) no ventrículo de peixes dos grupos controle, WIN e HU.
- Determinar a razão PLB/SERCA2a nos diferentes grupos experimentais.
- Determinar a razão NCX1/SERCA2a nos diferentes grupos experimentais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Os peixes foram adquiridos da piscicultura Águas Claras, em Mococa-SP, ainda juvenis e aclimatados por 30 dias antes da realização dos experimentos. O início dos experimentos foi realizado após aprovação do procedimento pela CEUA/UFSCar (CEUA nº 4997170718).

Foram necessários, ao todo, 30 peixes (matrinxã, *Brycon amazonicus*) divididos em 3 subgrupos experimentais contendo 10 animais cada. Um dos subgrupos foi o grupo controle (Ct, n = 10), que recebeu uma injeção intraperitoneal de 0,5 mL de veículo (2,5% DMSO em salina com uma gota de Tween-20, SOLBRIG et al., 2013) sem qualquer canabinoide incluso. O segundo subgrupo (WIN, n=10) recebeu uma dose única na concentração de 1 mg/kg do agonista não específico WIN 55 212-2 (Caymam Chemical), via intraperitoneal, diluído em veículo ((2,5% DMSO em salina com uma gota de Tween-20); a interação desse agonista com

receptores canabinoides pode se dar tanto via CB1 quanto via CB2. O terceiro subgrupo (HU, n=10) recebeu uma dose única de mesma concentração, porém contendo o canabinoide sintético HU 308 (Cayman Chemical), específico para ativação dos receptores CB2, diluído em veículo (2,5% DMSO em salina com uma gota de Tween-20).

As doses pré-escolhidas foram baseadas em estudos realizados por González et al. (2011) e Wang et al. (2012) que avaliaram o papel efetivo desses agonistas no modelo de isquemia-reperfusão miocárdica em mamíferos. Adicionalmente, a dose testada no presente estudo é bem menor àquelas empregadas na prática médica. Por exemplo, para o canabidiol a dose utilizada em adultos para o tratamento da epilepsia é de 20-30 mg/kg/dia (SILVESTRO et al., 2019). Para o tratamento do mal de Parkinson, as doses utilizadas são entre 150-400 mg/dia, enquanto que para a esquizofrenia, as doses iniciais são de 40 mg/dia, podendo aumentar para até 1.280mg/dia, de acordo com o tratamento (BERGAMASCHI et al., 2011).

Após 24 horas das aplicações, os animais foram sacrificados por overdose em banho com anestésico (250 mg/L de benzocaína) em conformidade com os procedimentos descritos pela AVMA (LEARY; AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2013) e pelo CONCEA (2016). Os corações foram cuidadosamente removidos, lavados em solução salina 0,9%, e os ventrículos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer (-80°C) até o momento das análises, como descrito por MONTEIRO et al. (2016).

3.2 Análise da expressão de proteínas envolvidas no manejo de Ca²⁺

Para a extração das proteínas, os ventrículos foram homogeneizados em tampão hiperosmótico (sacarose 250 mM; Tris 50 mM; EDTA 1 mM; pH 7,4) e centrifugados a 12.000 rpm por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante passou por ultra-centrifugação a 100.000 g a 4 °C por 60 minutos gerando precipitados. Estes foram ressuspensos em cerca de 100 a 150 µL de tampão Tris-EDTA (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4). A quantificação de proteínas nessas amostras foi realizada segundo o método de Bradford, a 595 nm, em espectrofotômetro de microplaca (KRUGER, 1994).

A técnica de *Western Blotting* (WB) é utilizada por pesquisadores para separar e identificar proteínas, mesmo em baixíssimas concentrações, e outras variadas funções, tais como: investigar abundância proteica, atividade de quinase, localização celular, interação proteína-proteína, ou monitoramento de modificações pós-traducionais, ubiquitinação,

glicosilação, metilação, etc (BASS et al., 2017). Tal procedimento baseia-se em 3 etapas principais, sendo, respectivamente: (1) separação das proteínas contidas na amostra de acordo com o tamanho pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, (2) transferência da proteína para uma membrana, denominada “membrana de transferência”, (3) imersão da membrana de transferência em solução contendo anticorpos primários específicos e, posteriormente, anticorpos secundários (específicos para os anticorpos primários) para marcação da proteína e, conseqüentemente, sua possível visualização (YANG; MAHMOOD, 2012).

Para a realização do WB cerca de 100 µg de proteína das amostras foram adicionadas ao tampão de carregamento (Laemmli *buffer*: Ureia 0,5 mM, Sódio DS 0,17 mM, ditiotreitol 39 µM, Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0) e aquecidas durante 5 minutos a 95 °C. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em géis de SDS-poliacrilamida 8, 10 e 12%, para que fosse obtida uma clara identificação da proteína SERCA. Para NCX e PLB a concentração do gel foi de 10 e 12%, respectivamente. Os géis foram imersos em tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%) e submetidos a uma tensão de 100 V por 2 horas a temperatura ambiente.

Após o término da eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas dos géis para membranas de fluoreto de polividileno (PVDF) em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%, SDS 0,1%) a 4 °C, em um Mini TransBlot (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA) com corrente constante de 230 mA durante 10 horas. As membranas resultantes desse processo foram bloqueadas por 2 horas em uma solução de leite desnatado a 5% (Molico, Nestle®) em um tampão TBS-T (TrisHCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0,1%, pH 7,5).

As membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com os anticorpos policlonais de coelho anti-SERCA2a (ab91032, Abcam, 1:2000), de camundongo anti-PLB (05-205, Milipore, 1:2000) e o de coelho anti-NCX1 (A7419, ABclonal, 1:1000) diluídos em um tampão TBS-T. Logo após a incubação com o primário, foi utilizado um tampão de lavagem TBS-T para que o excesso fosse retirado e, em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-coelho IgG (0,5 µg/mL, sc-2034, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), anti-cabra IgG (0,5 µg/mL, sc-2355, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) e anti-camundongo IgG (0,5 µg/mL, AP308A, Milipore) conjugados à fosfatase alcalina em temperatura ambiente. Para controle da efetividade da marcação pelos anticorpos, foram

utilizadas amostras de ventrículos de rato, por estes serem mais próximo evolutivamente dos animais para os quais os anticorpos foram produzidos. Para cada um dos WB, foram aplicadas amostras de rato para efeitos de controle positivo.

As bandas foram detectadas utilizando o sistema revelador Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad, Laboratories, USA). As membranas foram digitalizadas e as bandas analisadas por densitometria no software *ImageJ*. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.) de densidade óptica normalizadas pela quantidade de actina-I (Santa Cruz Biotechnology, USA) detectada nas respectivas amostras obtida pelo mesmo ensaio.

3.3 Análise estatística

Os valores de todas as determinações foram expressos em média \pm E.P.M e somente as diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância foram consideradas ($P < 0,05$). Para comparações entre os grupos experimentais foi aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocidasticidade (GraphPad InStat v. 3.00 Software Inc., San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando a média das densidades ópticas normalizadas das membranas provenientes dos ensaios das amostras dos grupos expostos ao WIN 55 212-2 e ao HU-308 com a média da densidade óptica da membrana do grupo controle, não houve alteração significativa da expressão da SERCA2a no grupo WIN em relação ao grupo controle ($p > 0,05$), diferentemente do observado para o grupo HU, cuja expressão se mostrou cerca de 27,5% superior em relação ao grupo controle (Ct: $0,98 \pm 0,08$, WIN: $0,88 \pm 0,09$ e HU: $1,25 \pm 0,06$, valores são média \pm EPM em unidades arbitrárias) (Figura 3).

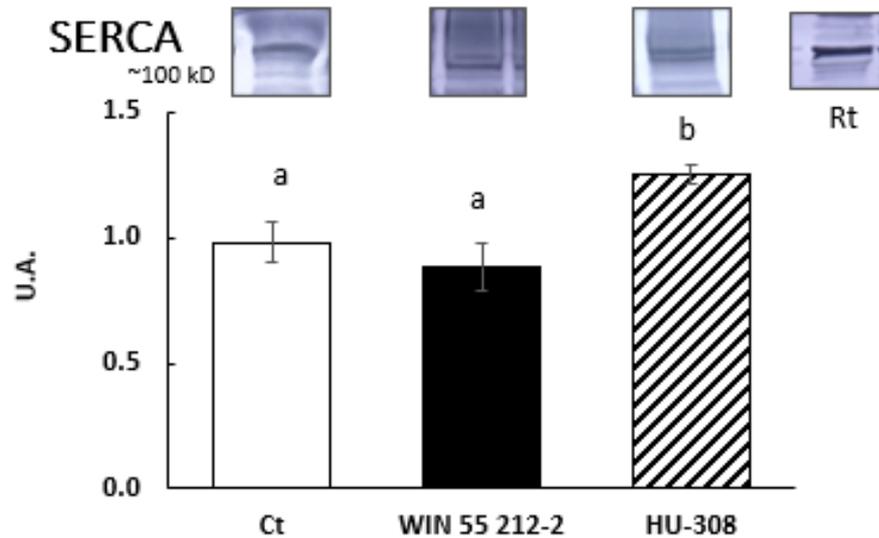


Figura 3: Densidade óptica, em unidades arbitrárias (U.A.), da expressão da proteína SERCA no ventrículo de matrinxã, *Brycon amazonicus*, dos grupos Ct (n=10), WIN (n=10) e HU (n=10). Valores são média \pm E.P.M. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Rt: banda obtida a partir de amostra de tecido cardíaco de rato para controle positivo da ação dos anticorpos utilizados.

Esses resultados indicam que a SERCA2a é modulada significativamente pela ativação dos receptores CB2. A maior parte dos estudos que relacionam o SEC a doenças cardiovasculares o fazem a partir de eventos desencadeados pela modulação de CB2. Corroborando com os resultados encontrados, Sterin-Borda et al. (STERIN-BORDA; DEL ZAR; BORDA, 2005) verificaram que em ensaios de contratilidade com tecido atrial de ratos tratados com o agonista JWH015, específico para o receptor CB2, houve um aumento significativo na força contrátil correlacionado ao aumento da produção do AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) e a consequente ativação da PKA, o que poderia modular positivamente a atividade da SERCA2a promovendo uma maior taxa de captação de Ca^{2+} pelo RS.

Oláh et al (2016) demonstraram que a ativação dos receptores CB1 pode inibir tanto a SERCA2a quanto a liberação de Ca^{2+} do RS durante o acoplamento excitação-contração, via ativação da proteína Gi/o e redução da atividade da PKA tanto em ensaios *in vivo* quanto *in vitro* no tecido cardíaco de ratos nocauteados. Assim, como o WIN 55 212-2 é um agonista não seletivo para receptores canabinoides, a ativação do receptor CB1 pode ter contrabalanceado os efeitos da ativação de CB2 e os níveis de expressão da SERCA2a permaneceram inalterados em relação ao controle.

Em estudos realizados em linhagens de rato também foi observado efeito inotrópico positivo atribuído ao antagonismo de receptores CB1 (SLAVIC et al., 2013) via aumento da expressão cardíaca da SERCA2a, influenciando a $[Ca^{2+}]_i$. Apesar de não ser evidente o papel direto de receptores CB2 na contratilidade, em átrios isolados de rato foram encontradas respostas positivas na contratilidade pelo aumento da produção do mensageiro intracelular cAMP (KASCHINA, 2016). O AMPc é um dos principais ativadores da PKA, enzima que desempenha um papel importantíssimo na regulação da proteína inibitória da SERCA, a PLB. Estes achados sugerem que a ativação de CB2 induz efeitos positivos na contratilidade ao influenciar a liberação de Ca^{2+} pelo RS impulsionando a atividade da adenilato ciclase (STERIN-BORDA; DEL ZAR; BORDA, 2005), responsável pela conversão de ATP em AMPc.

A modulação de CB2 também já foi identificada na indução de respostas intracelulares via membros da família MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos). Essa ativação promove a expressão de diversos genes envolvidos na sobrevivência, proliferação e resposta ao estresse celulares (HOWLETT, 2005). Em células do endotélio vascular estudadas *in vitro*, a modulação da anandamida, um endocanabinoide já bem estabelecido na literatura, levou ao aumento da $[Ca^{2+}]_i$ via ativação da fosfolipase C (PLC) e liberação do íon pelo retículo endoplasmático (ZORATTI et al., 2003). Quando adicionado o antagonista de receptores CB2 SR144528, o aumento observado do Ca^{2+} quando sob a modulação da anandamida caiu em 90%, determinando que a atividade do endocanabinoide estudado no que diz respeito aos níveis de Ca^{2+} nessas células depende de CB2.

Em relação a proteína PLB, aumentos significativos na sua expressão foram observados tanto no grupo WIN (168%) quanto no grupo HU (67%) (Ct: $0,82 \pm 0,02$; WIN: $2,20 \pm 0,06$; HU: $1,38 \pm 0,04$; média \pm EPM, em unidades arbitrárias) (Figura 4). Dessa forma, a ativação do SEC promove a *up-regulation* da expressão do PLB, principalmente após a ativação de ambos os receptores CB1 e CB2 pelo agonista não seletivo em que uma expressão significativamente maior (59,4%) em relação ao grupo HU foi registrada.

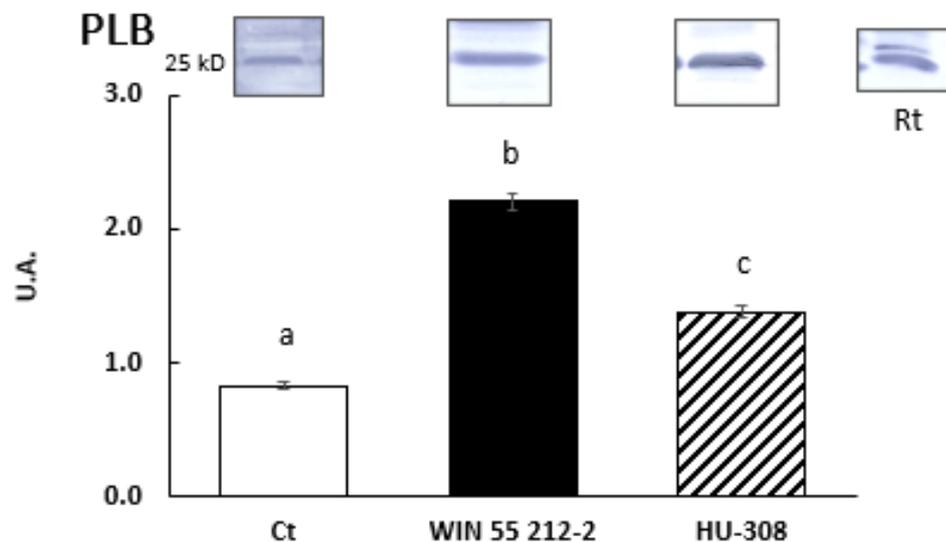


Figura 4: Densidade óptica, em unidades arbitrárias (U.A.), da expressão da proteína PLB no ventrículo de matrinxã, *Brycon amazonicus*, dos grupos Ct (n=10), WIN (n=10) e HU (n=10). Valores são média \pm E.P.M. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Rt: banda obtida a partir de amostra de tecido cardíaco de rato para controle positivo da ação dos anticorpos utilizados.

Como a expressão da SERCA2a não foi alterada após a ativação dos receptores CB1 e CB2, e sendo o PLB responsável por regular sua função, é provável que o aumento acentuado da expressão do PLB no grupo WIN tenha ocorrido na tentativa de regular positivamente a atividade da SERCA para garantir a manutenção do AE-C. Entretanto, de acordo com Periasamy e colaboradores (2008), a proporção de PLB para SERCA é determinante na captação de Ca^{2+} pelo RS e na contratilidade cardíaca. Um aumento na razão PLB/SERCA resulta na inibição da bomba SERCA e depressão na contratilidade cardíaca, enquanto uma menor relação PLB/SERCA sugere um aumento da taxa de captação e armazenamento de Ca^{2+} no RS, e consequente, uma maior disponibilidade do íon a cada contração, no processo de liberação de Ca^{2+} -induzida por Ca^{2+} .

Para o grupo WIN, a razão PLB/SERCA (Figura 5) foi de 2,5, enquanto para o grupo HU foi de 1,10 exibindo um aumento proeminente comparando o valor desta razão encontrado para o grupo controle, 0,84. Dessa forma, a ativação dos receptores CB1 e CB2 pelo agonista WIN 55 212-2, pode promover mais efeitos negativos no manejo de Ca^{2+} e na força contrátil, em relação à ativação apenas do receptor CB2 pelo agonista seletivo HU-308 devido a atividade inibitória que a proteína PLB exerce na bomba SERCA. Como a razão encontrada para o grupo WIN foi cerca de duas vezes maior que a encontrada pelo grupo HU e quase três vezes maior que a encontrada para o grupo controle, pode-se dizer que diferenças na proporção PLB/SERCA

podem estar fortemente associadas ao receptor CB1 ou à coativação de receptores canabinoides no tecido cardíaco de matrinxã. Em músculo esquelético de mamífero, a ativação do CB1 ou seu nocaute não afetou a força muscular diretamente, entretanto, sua ativação diminuiu a sensibilidade ao Ca^{2+} do aparelho contrátil e tornou as fibras musculares mais propensas à fadiga (Oláh et al., 2016).

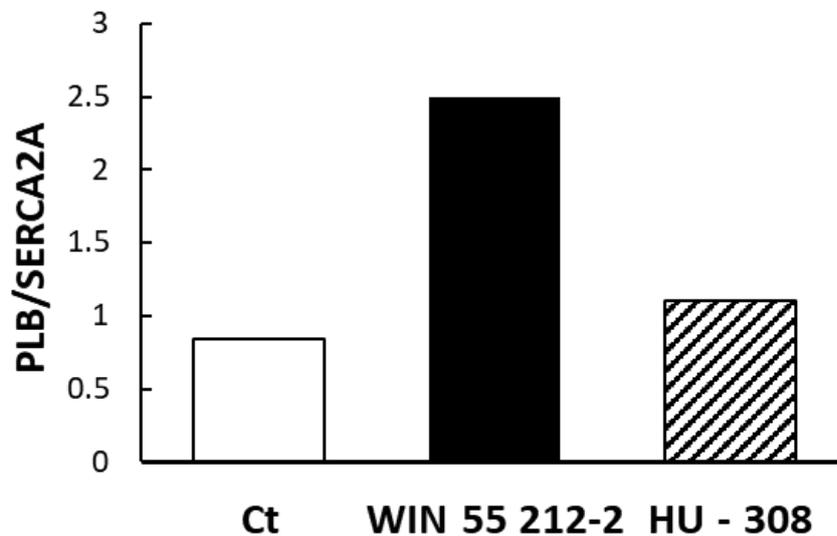


Figura 5: Gráfico relativo aos dados obtidos para a razão PLB/SERCA dos grupos Ct, WIN e HU.

Em estudos conduzidos com tecido ventricular humano de pessoas com cardiopatias foi encontrado que a razão PLB/SERCA aumentou significativamente em comparação ao coração de pacientes sem falência cardíaca (KUBO et al., 2021), corroborando com a hipótese de que a modulação de receptores canabinoides que culminam no aumento desta razão pode sim estar associada a eventos negativos atribuídos ao tecido cardíaco. Apesar das notáveis diferenças entre a dinâmica cardiovascular de peixes e mamíferos, alterações na razão PLB/SERCA em ambos os organismos podem trazer informações sobre a modulação de cálcio pelo RS, independente do quão expressivo isso possa ser para o AE-C de forma geral.

A Figura 6 apresenta os valores médios da densidade da proteína NCX1 observadas nos grupos experimentais (Ct: $0,73 \pm 0,02$; WIN: $1,75 \pm 0,02$; HU: $1,90 \pm 0,04$). Aumentos significativos na expressão do NCX foram observados no grupo WIN (139%) e no grupo HU (160%) em relação aos valores obtidos para o grupo controle. Nos grupos WIN e HU, identificamos a presença de outra isoforma da proteína NCX1, indicando que a ativação do SEC

apresenta influência direta nas etapas de processamento, tradução e/ou regulação desta proteína no miocárdio ventricular de *Brycon amazonicus*. A primeira isoforma, corresponde àquela que também foi observada no grupo controle, apresentando massa molecular em torno de 67 kDa, enquanto que a segunda isoforma aparenta ter entre 60-63 kDa.

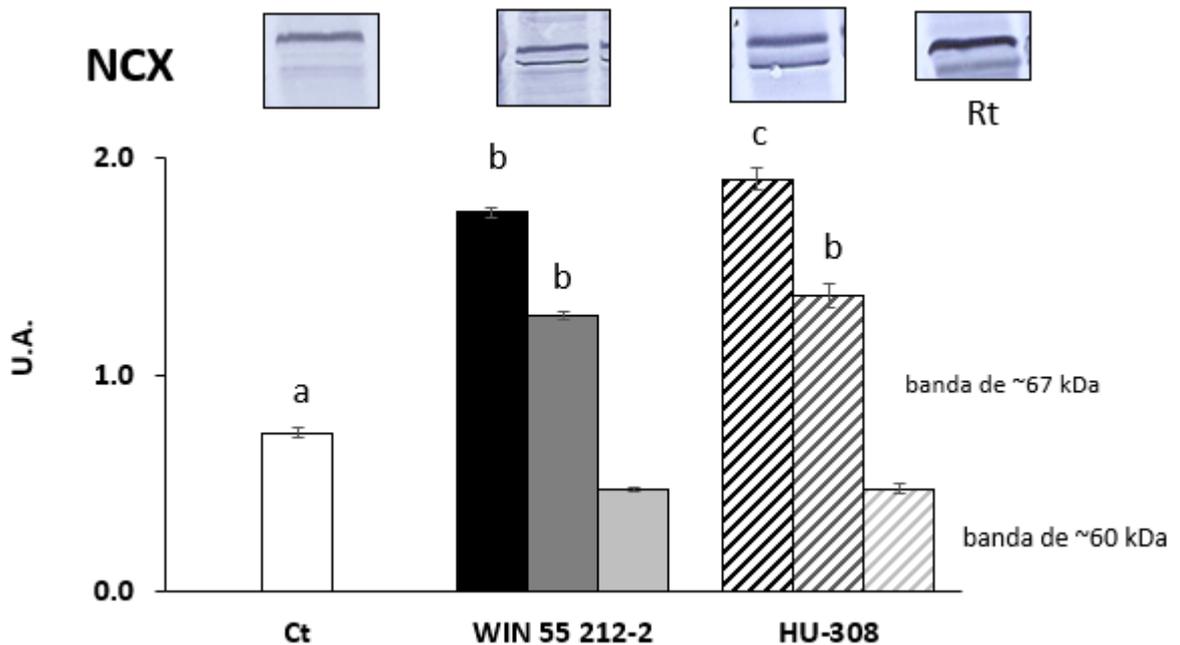


Figura 6: Densidade óptica, em unidades arbitrárias (U.A.), da expressão da proteína NCX no ventrículo de matrinxã, *Brycon amazonicus*, dos grupos Ct (n=10), WIN (n=10) e HU (n=10). Nos grupos teste estão dados totais da expressão das duas isoformas e dados de cada uma delas isoladamente. Valores são média \pm E.P.M. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). Rt: banda obtida a partir de amostra de tecido cardíaco de rato para controle positivo da ação dos anticorpos utilizados.

Estudos envolvendo a expressão e homologia dos trocadores em peixes a partir de uma abordagem filogenética identificaram pelo menos três isoformas para a proteína NCX (MARSHALL et al., 2005) cujas funções e distribuição ainda trazem muitas dúvidas. Os achados obtidos nesta pesquisa sugerem fortemente que a modulação de receptores do SEC podem induzir a expressão de diferentes isoformas de NCX1 no ventrículo de matrinxã, podendo servir para a mesma finalidade na investigação dos trocadores em outras espécies.

Essas análises levam à interpretação de que proteínas NCX se tornam diferentemente expressas no tecido cardíaco após a ativação dos receptores CB1 e/ou CB2, indicando que, provavelmente o trocador desempenhe um papel significativo na ciclagem de Ca^{2+} tanto na extrusão (modo normal) quanto no influxo (em seu modo reverso) após a ativação do SEC. Essa hipótese é reforçada pela relação NCX1/SERCA2a. Considerando as duas possíveis isoformas

em comparação ao que foi observado no grupo controle, pode-se afirmar que houve um aumento considerável tanto no grupo WIN quanto no grupo HU de, respectivamente, 1,44 e 1,09 para a razão NCX1/SERCA2a.

Ainda no que diz respeito à expressão da proteína NCX e as diferentes bandas observadas para os grupos testes é necessário pontuar que diferentes padrões de glicosilação ou demais alterações pós-transcricionais podem ser as responsáveis pela membrana obtida (KHANANSHVILI, 2017, 2020) o que sugere que, caso a influência do SEC não exerça um papel na expressão das variantes de NCX, talvez sua modulação acarrete em mudanças no padrão estrutural da mesma, podendo interferir na sua função.

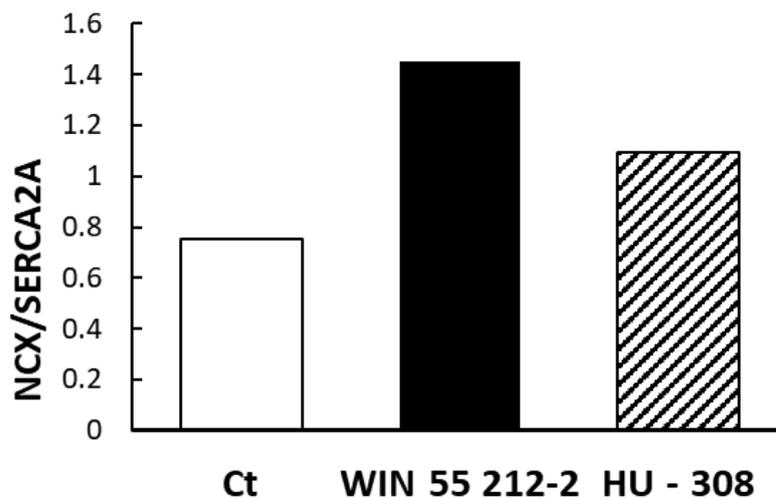


Figura 7: Gráfico relativo aos dados obtidos para a razão NCX/SERCA dos grupos Ct, WIN e HU.

Em resumo, a ativação dos receptores CB1 + CB2 aumenta a expressão do NCX1, porém não altera a expressão da SERCA2a no grupo WIN, ao mesmo tempo que induz o aumento acentuado da expressão do PLB. Esses resultados podem indicar algum prejuízo causado pela ativação simultânea de CB1 e CB2 no manejo de Ca^{2+} pelo RS e, conseqüentemente, na contratilidade miocárdica. Por outro lado, a ativação apenas dos receptores CB2 induzem elevações proporcionais na expressão da SERCA, do PLB e do NCX, sugerindo uma melhora na taxa de ciclagem de Ca^{2+} , o que resultaria em aumento na força e taxa de contração.

Obviamente tais hipóteses devem ser testadas, agora, por meio de experimentos de contratilidade cardíaca *ex vivo*, somados à análises histológicas e bioquímicas para a melhor compreensão dos efeitos do SEC no miocárdio ventricular.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a ativação dos receptores canabinoides CB1 e CB2 pode desempenhar um papel importante na função cardíaca, uma vez que tem se mostrado capaz de regular positivamente a expressão de proteínas que desempenham um papel fundamental no acoplamento excitação-contração cardíaco. Os efeitos são particularmente evidentes após a ativação apenas do receptor CB2, que ocasionou aumentos na expressão da SERCA2a, PLB e NCX1, sem alterações tão pronunciadas na razão PLB/SERCA2a e NCX1/SERCA2a. Assim, a ativação do receptor CB2, promovida pelo agonista HU-308, pode ocasionar efeitos inotrópico e lusitrópico positivos.

Os resultados também sugerem que o tecido cardíaco de matrinxã é dotado de receptores CB1 e CB2 e que o SEC desempenha um papel potencialmente relevante na regulação da contratilidade miocárdica que pode e deve ser explorado. Além disso, existem regiões conservadas e semelhantes entre as proteínas do peixe com relação aos mamíferos, comprovada pela ligação dos anticorpos específicos para mamíferos anti-SERCA, anti-PLB e anti-NCX nas respectivas proteínas do matrinxã. Como as funções da SERCA2a, PLB e NCX1 são conservadas de peixes a mamíferos, os estudos realizados no modelo de peixes podem ser complementares aos modelos existentes de mamíferos e úteis em triagem de alvos com potencial atividade terapêutica.

Assim, o presente estudo contribui com informações não somente sobre a influência que canabinoides possuem no manejo de cálcio e na expressão de proteínas do acoplamento excitação-contração, como também fornecem dados para o entendimento do SEC e da distribuição dos receptores canabinoides em vertebrados basais. A relação esperada e reforçada pelos resultados obtidos, entre a expressão das proteínas selecionadas e os eventos que determinam a contratilidade cardíaca sob efeito de canabinoides, indicam a potencialidade desse campo de estudo que deve continuar sendo explorado, uma vez que a expressão das proteínas SERCA2a, PLB e NCX1, mostraram-se alteradas após 24 horas de tratamento com os agonistas canabinoides, o que, potencialmente impacta o manejo de Ca^{2+} e o desempenho contrátil dos cardiomiócitos.

6 REFERÊNCIAS

- AHO, E.; VORNANEN, M. Ca²⁺-ATPase activity and Ca²⁺ uptake by sarcoplasmic reticulum in fish heart: effects of thermal acclimation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 4, p. 525 -532, 1998.
- AN, D.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. WIN55,212-2, a dual modulator of cannabinoid receptors and G protein-coupled inward rectifier potassium channels. **Biomedicines**, v. 9, n. 5, p. 484, 2021.
- BERGAMASCHI, M. M. et al. Safety and side effects of cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent. **Current Drug Safety**, 2011.
- BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198–205, 2002.
- BOVO, E. et al. Mechanisms of Ca²⁺ handling in zebrafish ventricular myocytes. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 465, n. 12, p. 1775–1784, 2013.
- BRADFORD, Y. M. et al. Zebrafish models of human disease: Gaining insight into human disease at ZFIN. **ILAR Journal**, v. 58, n. 1, p. 4–16, 2017.
- CERRA, M. C.; IMBROGNO, S. Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. **Acta Physiologica**, v. 205, n. 1, p. 9-25, 2012.
- CONCEA. **Normativas do CONCEA**. 3. ed. Brasília/Brasil: [s.n.].
- COTTONE, E. et al. Expression and distribution of CB1 cannabinoid receptors in the central nervous system of the African cichlid fish *Pelvicachromis pulcher*. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 485, n. 4, p. 293–303, 2005.
- DI MARZO, V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 3, p. 134–140, 2006.
- DUERR, G. D. et al. The endocannabinoid-CB2 receptor axis protects the ischemic heart at the early stage of cardiomyopathy. **Basic Research in Cardiology**, v. 109, n. 4, p. 425, 2014.
- EISNER, D. A. et al. Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. **Circulation Research**, v. 121, n. 2, p. 181–195, 2017.
- ELPHICK, M. R. Evolution of cannabinoid receptors in vertebrates: Identification of a CB₂ gene in the puffer Fish *Fugu rubripes*. **The Biological Bulletin**, v. 202, n. 2, p. 104–107, 2002.
- FRANK, K.; KRANIAS, E. G. Phospholamban and cardiac contractility. **Annals of Medicine**, v. 32, n. 8, p. 572–578, 2000.
- FULMER, M. L.; THEWKE, D. P. The Endocannabinoid system and heart disease: The role of cannabinoid receptor type 2. **Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets**, v. 18, n. 1, p. 34–51, 2018.
- GONZÁLEZ, C. et al. Cannabinoid/agonist WIN 55,212-2 reduces cardiac ischaemia–reperfusion injury in Zucker diabetic fatty rats: role of CB2 receptors and iNOS/eNOS. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 27, n. 4, p. 331–340, 2011.
- GORSKI, P. A.; CEHOLSKI, D. K.; YOUNG, H. S. Structure-function relationship of the SERCA pump and its regulation by phospholamban and sarcolipin. In: KREBS, J. (Ed.). **Membrane Dynamics and Calcium Signaling**. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 981p. 77–119.

- HAN, X.; FERRIER, G. R. Contribution of Na⁺-Ca²⁺ exchange to stimulation of transient inward current by isoproterenol in rabbit cardiac Purkinje fibers. **Circulation Research**, v. 76, n. 4, p. 664–674, 1995.
- HANUS, L. et al. HU-308: A specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 25, p. 14228–14233, 1999.
- HAUSTEIN, M. et al. Excitation-contraction coupling in zebrafish ventricular myocardium is regulated by trans-sarcolemmal Ca²⁺ influx and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125654, 2015.
- HILGEMANN, D. W. Regulation and deregulation of cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches. **Nature**, v. 344, n. 6263, p. 242–245, 1990.
- HILGEMANN, D. W. Regulation of ion transport from within ion transit pathways. **Journal of General Physiology**, v. 152, n. 1, p. e201912455, 2020.
- HINE, B.; TORRELIO, M.; GERSHON, S. Analgesic, heart rate, and temperature effects of delta 8-THC during acute and chronic administration to conscious rats. **Pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 65–72, 1977.
- HOWLETT, A. C. Cannabinoid receptor signaling. In: PERTWEE, R. G. (Ed.). . **Cannabinoids**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. v. 168p. 53–79.
- JOSHI, N.; ONAIVI, E. S. Endocannabinoid system components: Overview and tissue distribution. In: BUKIYA, A. N. (Ed.). . **Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology**. Cham: Springer International Publishing, 2019. v. 1162p. 1–12.
- KASCHINA, E. Cannabinoid CB1/CB2 Receptors in the Heart: Expression, Regulation, and Function. In: MECCARIELLO, R.; CHIANESE, R. (Eds.). . **Cannabinoids in Health and Disease**. [s.l.] InTech, 2016. p. 169–185.
- KHANANSHVILI, D. Structure-dynamic coupling through Ca²⁺-binding regulatory domains of mammalian NCX isoform/splice variants. In: KREBS, J. (Ed.). . **Membrane Dynamics and Calcium Signaling**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 981p. 41–58.
- KHANANSHVILI, D. Basic and editing mechanisms underlying ion transport and regulation in NCX variants. **Cell Calcium**, v. 85, p. 102131, 2020.
- KUBO, H. et al. Patients with end-stage congestive heart failure treated with beta-adrenergic receptor antagonists have improved ventricular myocyte calcium regulatory protein abundance. **Circulation**, v. 104, n. 9, p. 1012-1018, 2001.
- LANGENBACHER, A. D. et al. Mutation in sodium-calcium exchanger 1 (NCX1) causes cardiac fibrillation in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 49, p. 17699–17704, 2005.
- MACH, F.; MONTECUCCO, F.; STEFFENS, S. Cannabinoid receptors in acute and chronic complications of atherosclerosis: Cannabinoid receptors in atherosclerosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 290–298, 2008.
- MARSHALL, C. R. et al. Phylogeny of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) genes from genomic data identifies new gene duplications and a new family member in fish species. **Physiological Genomics**, v. 21, n. 2, p. 161–173, 2005.

- MONTECUCCO, F.; DI MARZO, V. At the heart of the matter: the endocannabinoid system in cardiovascular function and dysfunction. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 6, p. 331–340, 2012.
- MONTEIRO, D. A. et al. Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein from *Rhinocerophis alternatus* snake venom promotes positive inotropism and chronotropism in fish heart. **Toxicon**, v. 110, p. 1–11, 2016.
- MONTEIRO, D. A. et al. Impact of waterborne and trophic mercury exposures on cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish *Brycon amazonicus* and *Hoplias malabaricus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 201, p. 26–34, 2017.
- MUKHOPADHYAY, P. et al. CB1 Cannabinoid Receptor Inhibition: Promising Approach for Heart Failure? **Congestive Heart Failure**, v. 14, n. 6, p. 330–334, 2008.
- OLÁH, T. et al. Cannabinoid signalling inhibits sarcoplasmic Ca²⁺ release and regulates excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle: CB1 receptors and SR calcium release. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 24, p. 7381–7398, 2016.
- PERIASAMY, M.; BHUPATHY, P.; BABU, G. J. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. **Cardiovascular Research**, v. 77, n. 2, p. 265–273, 2007.
- PHILIPSON, K. D. et al. The Na⁺/Ca²⁺ Exchange molecule: An overview. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 976, n. 1, p. 1–10, 2006.
- PIOTROWSKA, Ž. et al. Sex differences in distribution of cannabinoid receptors (CB1 and CB2), S100A6 and CacyBP/SIP in human ageing hearts. **Biology of Sex Differences**, v. 9, n. 1, 2018.
- REPEL, M. et al. Regulation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) in the murine embryonic heart. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 1, p. 99–108, 2007.
- RODRIGUEZ-MARTIN, I. et al. Characterization of two duplicate zebrafish Cb2-like cannabinoid receptors. **Gene**, v. 389, n. 1, p. 36–44, 2007.
- SHIELS, H. A. Cardiomyocyte Morphology and Physiology. In: **Fish Physiology**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 36p. 55–98.
- SHIELS, H. A.; GALLI, G. L. J. The Sarcoplasmic reticulum and the evolution of the vertebrate heart. **Physiology**, v. 29, n. 6, p. 456–469, 2014.
- SILVER, R. J. The Endocannabinoid System of Animals. **Animals**, v. 9, n. 9, p. 686, 16 set. 2019.
- SILVESTRO, S. et al. Use of Cannabidiol in the treatment of epilepsy: Efficacy and security in clinical trials. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1459, 2019.
- SIMMERMAN, H. K. B.; JONES, L. R. Phospholamban: Protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 4, p. 921–947, 1998.
- SLAVIC, S. et al. Cannabinoid receptor 1 inhibition improves cardiac function and remodelling after myocardial infarction and in experimental metabolic syndrome. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 7, p. 811–823, 2013.

SMOUM, R. et al. CB2 cannabinoid receptor agonist enantiomers HU-433 and HU-308: An inverse relationship between binding affinity and biological potency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 28, p. 8774–8779, 2015.

STEFFENS, S. et al. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. **Nature**, v. 434, n. 7034, p. 782–786, 2005.

STERIN-BORDA, L.; DEL ZAR, C. F.; BORDA, E. Differential CB1 and CB2 cannabinoid receptor-inotropic response of rat isolated atria: Endogenous signal transduction pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1705–1713, 2005.

SZCZESNA, D. et al. Altered Regulation of Cardiac Muscle Contraction by Troponin T Mutations That Cause Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 624–630, 2000.

TOTH, A. et al. Potential Therapeutic Effects of Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition in cardiac diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3294–3321, 2009.

WANG, P.-F. et al. Cannabinoid-2 receptor activation protects against infarct and ischemia–reperfusion heart injury: **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 301–307, 2012.

WHO. **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 17 fev. 2021.

XU, C. et al. A structural model for the catalytic cycle of Ca²⁺-ATPase. **Journal of Molecular Biology**, v. 316, n. 1, p. 201–211, 2002.

YAMAGUCHI, F.; MACRAE, A. D.; BRENNER, S. Molecular cloning of two cannabinoid type 1-like receptor genes from the puffer fish *Fugu rubripes*. **Genomics**, v. 35, n. 3, p. 603–605, 1996.

ZORATTI, C. et al. Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB₂ receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells: Anandamide activates endothelial Ca²⁺. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 8, p. 1351–1362, 2003.