

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

GABRIELLE SILVEIRA DE PAULA

**EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO/DIGESTÃO E DO JEJUM PROLONGADO
SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA DE CASCAVÉIS,
*Crotalus durissus terrificus***

**SÃO CARLOS - SP
2012**

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

GABRIELLE SILVEIRA DE PAULA

**EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO/DIGESTÃO E DO JEJUM PROLONGADO
SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA DE CASCAVÉIS,
*Crotalus durissus terrificus***

**Dissertação apresentada ao Programa
Interintitucional de Pós Graduação em
Ciências Fisiológicas (PIPGCF UFSCar –
UNESP), para obtenção do título de Mestre
em Ciências Fisiológicas**

Orientação: Profª Dra. Ana Lúcia Kalinin

**SÃO CARLOS - SP
2012**

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

P324ea Paula, Gabrielle Silveira de.
Efeitos da alimentação/digestão e do jejum prolongado sobre a função cardíaca de cascavéis, *Crotalus durissus terrificus* / Gabrielle Silveira de Paula. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
165 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Fisiologia. 2. Rianodina. 3. Retículo sarcoplasmático. 4. Trocador sódio-cálcio. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Gabrielle Silveira de Paula

Dia 14/09/2012

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Kalinin.....

Ana Lúcia Kalinin

Prof. Dr. Augusto Shinya Abe.....

JK

Prof. Dr Francisco Tadeu Rantin.....

Francisco Tadeu Rantin

“Mude. Mas comece devagar, porque a direção é mais importante que a velocidade.”

(Clarice Lispector)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a Ana Kalinin, pela orientação, pela amizade e apoio durante todo o trabalho, mas principalmente pela confiança que teve em mim ao propor o tema apresentado.

Aos professores Augusto Abe, Edwin Taylor e Tadeu Rantin agradeço por todas as sugestões de interpretação de dados que foram essenciais para a confecção do trabalho e pelas longas conversas sobre fisiologia que me fizeram ter uma visão muito mais ampla da importância dos nossos trabalhos.

Ao Prof. Cléo Leite pelo incentivo, pelas discussões de artigos e pelas cobranças que permitiram que os experimentos fossem concluídos com antecedência e que os dados fossem examinados com o máximo de cuidado.

Agradeço à FAPESP pelo financiamento e pela bolsa concedida.

Agradeço aos colegas de laboratório pela ajuda ao longo dos experimentos. Agradeço à Juliana Thomaz e à Vivian Zeraik pela amizade, pelo abrigo durante disciplinas e experimentos e pelas longas conversas que me mostraram que os problemas que eu tinha eram absolutamente normais.

Agradeço ao Jacarezário da UNESP - Rio Claro por toda experiência obtida enquanto trabalhei lá, pelos cursos fornecidos e pelas pessoas que conheci. Agradeço ao Carlinhos e Jonny pelo cuidado com os animais e pela amizade durante todos esses anos.

Agradeço a minha família por todo apoio e carinho, e principalmente por terem me dado a oportunidade para chegar até aqui. Agradeço ao meu marido, Cléo Leite, por todo amor, paciência, parceria, amizade, apoio e exemplo profissional, sem o qual teria sido muito difícil chegar até aqui.

E agradeço a todos que passaram pela minha vida e que de alguma forma me ajudaram no meu crescimento profissional.

RESUMO

O coração possui a importante capacidade de se remodelar diante de alterações nas demandas funcionais. Serpentes apresentam a capacidade de ingestão de grandes presas e a capacidade de sobreviver a grandes períodos de privação alimentar. A ingestão de grandes massas de alimento demanda uma elevação metabólica e leva a uma compensação na massa ventricular e um aumento na força de contração do miocárdio, evitando uma sobrecarga no sistema cardiovascular. Durante o jejum ocorre depleção da estrutura corpórea podendo também atingir o músculo cardíaco. Para descrever a função cardíaca da Cascavél Sul-americana, *Crotalus durissus terrificus*, e as possíveis alterações diante dos extremos metabólicos, foi testada a importância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), a funcionalidade do retículo sarcoplasmático (RS), a dependência do Ca^{2+} extracelular e o efeito da estimulação adrenérgica em animais adultos à temperatura constante de 30°C em período pós-absortivo, pico de SDA e após jejum prolongado. Observou-se que a massa ventricular se mantém estável mesmo durante os extremos metabólicos. Há uma diferença na geração de tensão entre as tiras da base e ápice ventriculares, presente nos 3 grupos alimentares e que pode se dar em função da orientação das fibras nas duas regiões do ventrículo. O teste com rianodina mostrou que o RS é funcional nos 3 grupos porém a dependência do cálcio proveniente do RS é menor após o jejum prolongado quando comparado aos demais grupos. O cálcio extracelular é o principal responsável pela contração do miócito cardíaco e o NCX, que fornece uma pequena parte de cálcio para a contração, é o principal bombeador de cálcio para fora da célula e é mais rápido do que a Ca^{2+} -ATPase do RS. O meio extracelular é a principal fonte de cálcio ativador da contração sendo que o aumento de cálcio circulante disponível para a contração nos animais durante a digestão ofereceria uma vantagem contrátil para este grupo sem necessidade de hipertrofia. A adrenalina produziu um aumento substancial na Fc capaz e ser mantido por diferentes frequências de estimulação nos 3 grupos testados.

Palavras chaves: Função cardíaca, *Crotalus durissus terrificus*, retículo sarcoplasmático, tensão isométrica, rianodina e NCX.

ABSTRACT

Some snakes have the ability to survive long periods without food and are capable to ingest large meal size. The ingestion of proportionally large preys triggers an expressive increase on the oxidative metabolic demand (SDA – Specific Dynamic Action) which can become several times higher than the resting metabolic rate. The two described extreme situations might lead to cardiac changes to adapt structure and function in order to afford these two opposite physiological demands. During long food deprivation (Phase III), the depletion of the body structure may affect the heart muscle. That should be reverted to the SDA and prevent an overload on cardiovascular system. The standard cardiac function of South-american Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*, was described as well as the changes caused by long term food deprivation and SDA. The importance of sodium-calcium exchanger (NCX), functionality of sarcoplasmic reticulum, extracellular calcium dependence and the effect of adrenergic stimulation were tested in adult animals at 30°C, under three different metabolic states: post-absorptive, SDA peak and food deprivation. The ventricular mass does not change after food deprivation and SDA. The force of contraction was higher in the base of the heart if compared to the apex, but there is no difference among the experimental groups and it is probably reflex of the fiber orientation in each region of the ventricle. The sarcoplasmic reticulum is functional in all groups, but the dependence of reticular calcium is lower during starvation compared to the other groups. Muscle contraction is mostly supported by the extracellular Ca^{2+} . The NCX have minor contribution to force generation (20%) but has a major role pumping calcium out of the cell (faster than SERCA). The increase in extracellular Ca^{2+} concentration during digestion can augment twitch force and would represent a contractile advantage to support the increased cardiac work without the development of hypertrophy. The adrenergic stimulation produced sustained increase in Fc for a wide range of stimulation frequencies in all the tested groups.

Key Words: Cardiac function, *Crotalus durissus terrificus*, sarcoplasmic reticulum, isometric tension, ryanodine and NCX.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| Considerações Gerais..... | 01 |
| CAPÍTULO 1 – Caracterização da Função Cardíaca de Cascavéis, <i>Crotalus durissus terrificus</i> | |
| 1. Introdução..... | 06 |
| 2. Objetivo..... | 12 |
| 3. Material e Métodos | |
| 3.1. Preparações experimentais..... | 13 |
| 3.2. Protocolos experimentais..... | 15 |
| 3.2.1. Efeito do tempo experimental | |
| 3.2.2. Tensão pós-pausa | |
| 3.2.3. Aumento da frequência de estimulação | |
| 3.2.4. Papel do cálcio extracelular | |
| 3.2.5. Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) | |
| 3.2.6. Efeito da adrenalina | |
| 3.2.7. Efeito da Rianodina | |
| 3.3. Forma de Apresentação e Tratamento Estatístico dos Resultados..... | 17 |
| 4. Resultados | |
| 4.1. Efeito do tempo..... | 19 |
| 4.2. Relação Força-Frequência: Comparação entre Força da Base e Ápice ventricular..... | 21 |
| 4.3. Participação do Retículo Sarcoplasmático no Ciclo Cardíaco..... | 26 |
| 4.4. Importância do NCX na Ciclagem de Cálcio..... | 30 |
| 4.5. Importância do Cálcio Extracelular..... | 34 |
| 4.6. Efeito da Adrenalina..... | 41 |
| 4.7. Tensão Pós-Pausa de 5 min..... | 48 |
| 5. Discussão | |
| 5.1. Comparação entre Força da Base e do Ápice Ventricular..... | 52 |
| 5.2. Efeito do Bloqueio do Retículo Sarcoplasmático..... | 53 |
| 5.3. Efeito do Bloqueio do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ | 55 |
| 5.4. Dependência do Cálcio Extracelular..... | 55 |
| 5.5. Efeito da Estimulação Adrenérgica..... | 56 |
| 6. Conclusões..... | 57 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 58 |

CAPÍTULO 2 – Ajustes da Função Cardíaca de Cascavéis, *Crotalus durissus terrificus*, Diante de Extremos Metabólicos como Jejum Prolongado e Digestão

| | |
|--|------------|
| 8. Introdução..... | 64 |
| 8.1. Ação Dinâmica Específica..... | 64 |
| 8.2. Jejum..... | 66 |
| 8.3. Hipertrofia Cardíaca e Digestão..... | 70 |
| 9. Objetivo..... | 76 |
| 10. Material e Métodos | |
| 10.1. Preparações experimentais..... | 77 |
| 10.2. Forma de Apresentação e Tratamento Estatístico dos Resultados..... | 78 |
| 11. Resultados | |
| 11.1. Hipertrofia Ventricular..... | 79 |
| 11.2. Relação Força-Frequência: Comparação entre Força da Base e Ápice Ventricular em Diferentes Regimes de Alimentação..... | 81 |
| 11.3. Participação do Retículo Sarcoplasmático no Ciclo Cardíaco..... | 89 |
| 11.4. Importância do NCX na Ciclagem de Cálcio..... | 97 |
| 11.5. Importância do Cálcio Extracelular..... | 105 |
| 11.6. Efeito da Adrenalina..... | 118 |
| 11.7. Tensão Pós-Pausa de 5 min..... | 131 |
| 12. Discussão | |
| 12.1. Hipertrofia Cardíaca..... | 140 |
| 12.2. Função Cardíaca durante a Digestão..... | 141 |
| 12.3. Função Cardíaca durante o Jejum..... | 145 |
| 13. Sumário..... | 152 |
| 14. Conclusões..... | 154 |
| 15. Referências Bibliográficas..... | 155 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Esquema ilustrativo dos parâmetros contráteis avaliados em cada protocolo..... 14
- Figura 2.** Set experimental utilizado para a obtenção dos registros da contração isométrica das tiras ventriculares de cascavéis: **A.** cilindro de mistura carbogênica; **B.** banho termostatizado; **C.** amplificador de força; **D.** estimuladores elétricos; **E.** banho com quatro cubetas; **F.** sistema informatizado com placa de aquisição e tratamento dos dados..... 15
- Figura 3.** Efeito do tempo de experimentação sobre a força de contração de tiras ventriculares de cascavél. Período de registro de 40 minutos (ANOVA OneWay, $p < 0,05$). Os pontos são média \pm EPM..... 19
- Figura 4.** Efeito do tempo de experimentação sobre o TPT de tiras ventriculares de cascavél sul americana. Período de registro de 40 minutos (ANOVA OneWay, $p < 0,05$). Os pontos são média \pm EPM..... 20
- Figura 5.** Efeito do tempo de experimentação sobre o THR de tiras ventriculares de cascavél sul-americana. Período de registro de 40 minutos (ANOVA OneWay, $p < 0,05$). Os pontos são média \pm EPM..... 20
- Figura 6.** Forças de contração registradas em tiras ventriculares de ápice ($n=24$; Ápice - □ linha pontilhada) e base ($n=21$; Base - ◇ linha pontilhada) ventricular e grupos de tiras com maiores ($n=10$; Maiores - ◇ linha contínua) e menores ($n=8$; Menores - □ linha contínua) forças de contração (mN/mm^2), em *C. durissus* durante o contínuo aumento na frequência de estimulação. Os valores são média \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 23
- Figura 7.** Alteração de TPT (ms) registradas em tiras ventriculares de ápice ($n=24$; Ápice - □ linha pontilhada) e base ($n=21$; Base - ◇ linha pontilhada) ventricular e grupos de tiras com maiores ($n=10$; Maiores - ◇ linha contínua) e menores ($n=8$; Menores - □ linha contínua) forças de contração (mN/mm^2), em *C. durissus* durante o contínuo aumento na frequência de estimulação. Os valores são média \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 23
- Figura 8.** Alteração de THR (ms) registradas em tiras ventriculares de ápice ($n=24$; Ápice - □ linha pontilhada) e base ($n=21$; Base - ◇ linha pontilhada) ventricular e grupos de tiras com maiores ($n=10$; Maiores - ◇ linha contínua) e menores ($n=8$; Menores - □ linha contínua) forças de contração (mN/mm^2), em *C. durissus* durante o contínuo aumento na frequência de estimulação. Os valores são média \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 24

- Figura 9.** Alteração da Taxa de Contração (mN/ms) registradas em tiras ventriculares de ápice (n=24; Ápice - □ linha pontilhada) e base (n=21; Base - ◇ linha pontilhada) ventricular e grupos de tiras com maiores (n=10; Maiores - ◇ linha contínua) e menores (n=8; Menores - □ linha contínua) forças de contração (mN/mm²), em *C. durissus* durante o contínuo aumento na frequência de estimulação. Os valores são média ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 24
- Figura 10.** Alteração da Taxa de Relaxamento (mN/ms) registradas em tiras ventriculares de ápice (n=24; Ápice - □ linha pontilhada) e base (n=21; Base - ◇ linha pontilhada) ventricular e grupos de tiras com maiores (n=10; Maiores - ◇ linha contínua) e menores (n=8; Menores - □ linha contínua) forças de contração (mN/mm²), em *C. durissus* durante o contínuo aumento na frequência de estimulação. Os valores são média ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 25
- Figura 11.** Relação força-frequência (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle -◇) e com rianodina (Rianodina -□). Os valores são média ± EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 27
- Figura 12.** Valores de TPT (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle -◇) e com rianodina (Rianodina -□). Os valores são média ± EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 27
- Figura 13.** Valores de THR (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle -◇) e com rianodina (Rianodina -□). Os valores são média ± EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 28
- Figura 14.** Valores de Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle -◇) e com rianodina (Rianodina -□). Os valores são média ± EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 28
- Figura 15.** Valores de Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle -◇) e com rianodina (Rianodina -□). Os valores são média ± EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 29
- Figura 16.** Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle -◇) e com LiCl (Lítio -□). Os valores são média ± EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA

| | |
|---|----|
| TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... | 31 |
| Figura 17. Alteração de TPT (%) em crescentes frequências de estimulação de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em solução controle (Controle \rightarrow) e com LiCl (Lítio \rightarrow). Os valores são media \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... | 31 |
| Figura 18. Alteração de THR (%) em crescentes frequências de estimulação de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em solução controle (Controle \rightarrow) e com LiCl (Lítio \rightarrow). Os valores são media \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... | 32 |
| Figura 19. Alteração de Taxa de Contração (%) em crescentes frequências de estimulação de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em solução controle (Controle \rightarrow) e com LiCl (Lítio \rightarrow). Os valores são media \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... | 32 |
| Figura 20. Alteração de Taxa de Contração (%) em crescentes frequências de estimulação de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em solução controle (Controle \rightarrow) e com LiCl (Lítio \rightarrow). Os valores são media \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... | 33 |
| Figura 21. Alteração na força de contração (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em crescente concentração de cálcio. Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$)..... | 36 |
| Figura 22. Alteração de TPT (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em crescente concentração de cálcio. Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$)..... | 36 |
| Figura 23. Alteração de THR (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em crescente concentração de cálcio. Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$)..... | 37 |
| Figura 24. Alteração de Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em crescente concentração de cálcio. Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$)..... | 37 |
| Figura 25. Alteração de Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em crescente concentração de cálcio. Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$)..... | 38 |
| Figura 26. Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em solução controle (Controle \rightarrow) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM \rightarrow). Os valores são media \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em | |

| | |
|---|----|
| cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... | 38 |
| Figura 27. Alteração de TPT (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em solução controle (Controle $-\diamond$) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM $-\square$). Os valores são media \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... | 39 |
| Figura 28. Alteração de THR (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em solução controle (Controle $-\diamond$) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM $-\square$). Os valores são media \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... | 39 |
| Figura 29. Alteração de Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em solução controle (Controle $-\diamond$) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM $-\square$). Os valores são media \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... | 40 |
| Figura 30. Alteração de Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em solução controle (Controle $-\diamond$) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM $-\square$). Os valores são media \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... | 40 |
| Figura 31. Alteração na força de contração (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em crescente concentração de adrenalina. Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$)..... | 43 |
| Figura 32. Alteração no TPT (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em crescente concentração de adrenalina. Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$)..... | 43 |
| Figura 33. Alteração no THR (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em crescente concentração de adrenalina. Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$)..... | 44 |
| Figura 34. Alteração na Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em crescente concentração de adrenalina. Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$)..... | 44 |
| Figura 35. Alteração na Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em crescente concentração de adrenalina. Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$)..... | 45 |
| Figura 36. Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de <i>C. durissus</i> em solução controle (Controle $-\diamond$), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M $-\square$) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M $-\Delta$). Os valores são | |

- media \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. A ausência de letras indica que não há diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 45
- Figura 37.** Alteração de TPT (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M \square) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M Δ). Os valores são media \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. A ausência de letras indica que não há diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 46
- Figura 38.** Alteração de THR (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M \square) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M Δ). Os valores são media \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. A ausência de letras indica que não há diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 46
- Figura 39.** Alteração de Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M \square) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M Δ). Os valores são media \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. A ausência de letras indica que não há diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 47
- Figura 40.** Alteração de Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M \square) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M Δ). Os valores são media \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. A ausência de letras indica que não há diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 47
- Figura 41.** Força de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle (preto), rianodina (cinza claro) e lítio (cinza escuro) após pausa de 5 minutos na estimulação. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 49
- Figura 42.** TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle (preto), rianodina (cinza claro) e lítio (cinza escuro) após pausa de 5 minutos na estimulação. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 49
- Figura 43.** THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle (preto), rianodina (cinza claro) e lítio (cinza escuro) após

pausa de 5 minutos na estimulação. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

50

Figura 44. Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle (preto), rianodina (cinza claro) e lítio (cinza escuro) após pausa de 5 minutos na estimulação. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

50

Figura 45. Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle (preto), rianodina (cinza claro) e lítio (cinza escuro) após pausa de 5 minutos na estimulação. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

51

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Raio-X mostrando a redução do tamanho do coração durante um regime de subnutrição extrema em humanos. A figura A mostra o tamanho do coração de uma pessoa saudável; B mostra o tamanho do coração após um longo período em regime de subnutrição severa e C mostra a recuperação do órgão após um período de alimentação sem restrição (Keys *et al*, 1950)..... 69
- Figura 02.** Massa ventricular em relação massa total em três grupos de cascavéis, *C. durissus* (n = 8 em cada grupo): Jejum (Cinza Claro), Pós-absortivo (Preto), Digestão (Cinza Escuro). Os dados são media ± EPM (ANOVA OneWay, Tukey p<0,05)..... 80
- Figura 03.** Massa coração em relação massa total em três grupos de cascavéis, *C. durissus* (n = 8 em cada grupo): Jejum (Cinza Claro), Pós-absortivo (Preto), Digestão (Cinza Escuro). Os dados são media ± EPM (ANOVA OneWay, Tukey p<0,05)..... 80
- Figura 04.** Forças de contração (mN/mm²) registradas durante o contínuo aumento na estimulação de tiras ventriculares de base (**Figura A**; Jejum n= 31, Digestão n=20, Pós-absortivo n=21) e ápice (**Figura B**; Jejum n= 14, Digestão n=28, Pós-absortivo n=24) de cascavél, *C. durissus*, durante o período Pós-absortivo (◇), Digestão (□) e Jejum (Δ). Os valores são media ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos em uma mesma frequência de estimulação. A ausência das mesmas indica que não há diferença entre os três grupos. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial de 0,2 Hz dentro do mesmo grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 84
- Figura 05.** Valores de TPT (ms) registradas durante o contínuo aumento na estimulação de tiras ventriculares de base (**Figura A**; Jejum n= 31, Digestão n=20, Pós-absortivo n=21) e ápice (**Figura B**; Jejum n= 14, Digestão n=28, Pós-absortivo n=24) de cascavél, *C. durissus*, durante o período Pós-absortivo (◇), Digestão (□) e Jejum (Δ). Os valores são media ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos em uma mesma frequência de estimulação. A ausência das mesmas indica que não há diferença entre os três grupos. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial de 0,2 Hz dentro do mesmo grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 85
- Figura 06.** Valores de THR (ms) registradas durante o contínuo aumento na estimulação de tiras ventriculares de base (**Figura A**; Jejum n= 31, Digestão n=20, Pós-absortivo n=21) e ápice (**Figura B**; Jejum n= 14, Digestão n=28, Pós-absortivo n=24) de cascavél, *C. durissus*, durante o período Pós-absortivo (◇), Digestão (□) e Jejum (Δ). Os valores são media ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos em uma mesma frequência de estimulação. A ausência das mesmas indica que não há diferença entre os três grupos. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial de 0,2 Hz dentro do mesmo grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 86
- Figura 07.** Valores de Taxa de Contração (mN/ms) registradas durante o contínuo aumento na estimulação de tiras ventriculares de base (**Figura A**; Jejum n=

31, Digestão n=20, Pós-absortivo n=21) e ápice (**Figura B**; Jejum n= 14, Digestão n=28, Pós-absortivo n=24) de cascavél, *C. durissus*, durante o período Pós-absortivo (◇), Digestão (□) e Jejum (Δ). Os valores são media ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos em uma mesma frequência de estimulação. A ausência das mesmas indica que não há diferença entre os três grupos. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial de 0,2 Hz dentro do mesmo grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 87

Figura 08. Valores de Taxa de Relaxamento (mN/ms) registradas durante o contínuo aumento na estimulação de tiras ventriculares de base (**Figura A**; Jejum n= 31, Digestão n=20, Pós-absortivo n=21) e ápice (**Figura B**; Jejum n= 14, Digestão n=28, Pós-absortivo n=24) de cascavél, *C. durissus*, durante o período Pós-absortivo (◇), Digestão (□) e Jejum (Δ). Os valores são media ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos em uma mesma frequência de estimulação. A ausência das mesmas indica que não há diferença entre os três grupos. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial de 0,2 Hz dentro do mesmo grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 88

Figura 09. Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com rianodina (Rianodina – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (□ - **Figura B**) e Pós-absortivo (◇ - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media ± EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do RS pela exposição à rianodina em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina. (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 92

Figura 10. Valores de TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com rianodina (Rianodina – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (□ - **Figura B**) e Pós-absortivo (◇ - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media ± EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do RS pela exposição à rianodina em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina. (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05)..... 93

Figura 11. Valores de THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com rianodina (Rianodina – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos

experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do RS pela exposição à rianodina em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina. (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

94

Figura 12. Valores de Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com rianodina (Rianodina – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do RS pela exposição à rianodina em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina. (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

95

Figura 13. Valores de Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com rianodina (Rianodina – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do RS pela exposição à rianodina em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina. (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

96

Figura 14. Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com LiCl (Lítio – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do NCX em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina.

(ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 100

Figura 15. Valores de TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com LiCl (Lítio – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são $\text{media} \pm \text{EPM}$. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do NCX em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição ao lítio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 101

Figura 16. Valores de THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com LiCl (Lítio – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são $\text{media} \pm \text{EPM}$. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do NCX em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição ao lítio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 102

Figura 17. Valores de Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com LiCl (Lítio – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são $\text{media} \pm \text{EPM}$. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do NCX em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após exposição ao lítio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 103

Figura 18. Valores de Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com LiCl (Lítio – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são $\text{media} \pm \text{EPM}$. O sinal * indica diferença entre a

- força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do NCX em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição ao lítio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 104
- Figura 19.** Alteração na força de contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos testados (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 110
- Figura 20.** Alteração no TPT (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos testados (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 110
- Figura 21.** Alteração no THR (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos testados (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 111
- Figura 22.** Alteração no Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos testados (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 111
- Figura 23.** Alteração no Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos testados (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 112
- Figura 24.** Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação o aumento do cálcio extracelular (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial

no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após o aumento à concentração de cálcio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 113

Figura 25. Valores de TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação o aumento do cálcio extracelular (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após o aumento à concentração de cálcio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 114

Figura 26. Valores de THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação o aumento do cálcio extracelular (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após o aumento à concentração de cálcio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 115

Figura 27. Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação o aumento do cálcio extracelular (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após o aumento à concentração de cálcio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 116

Figura 28. Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos

3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação o aumento do cálcio extracelular (**Figura E**). Os valores são média \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após o aumento à concentração de cálcio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 117

Figura 29. Alteração na força de contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos dentro da mesma concentração de adrenalina na solução fisiológica (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 123

Figura 30. TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos dentro da mesma concentração de adrenalina na solução fisiológica (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 123

Figura 31. THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos dentro da mesma concentração de adrenalina na solução fisiológica (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 124

Figura 32. Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos dentro da mesma concentração de adrenalina na solução fisiológica (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 124

Figura 33. Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos dentro da mesma concentração de adrenalina na solução fisiológica (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$)..... 125

Figura 34. Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha completa), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M – linha pontilhada pequena) e com 10^{-3} M de

Adrenalina (Adren 10^{-3} M – linha pontilhada grande) nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**), após à exposição à adrenalina 10^{-8} M (**Figura E**) e adrenalina 10^{-3} M (**Figura F**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e os testes com adrenalina (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

126

Figura 35. Valores TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha completa), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M – linha pontilhada pequena) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M – linha pontilhada grande) nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**), após à exposição à adrenalina 10^{-8} M (**Figura E**) e adrenalina 10^{-3} M (**Figura F**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e os testes com adrenalina (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

127

Figura 36. Valores de THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha completa), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M – linha pontilhada pequena) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M – linha pontilhada grande) nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**), após à exposição à adrenalina 10^{-8} M (**Figura E**) e adrenalina 10^{-3} M (**Figura F**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e os testes com adrenalina (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

128

Figura 37. Valores de Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha completa), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M – linha pontilhada pequena) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M – linha pontilhada grande) nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**), após à exposição à adrenalina 10^{-8} M (**Figura E**) e adrenalina 10^{-3} M (**Figura**

F). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e os testes com adrenalina (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

129

Figura 38. Valores de Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha completa), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M – linha pontilhada pequena) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M – linha pontilhada grande) nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**), após à exposição à adrenalina 10^{-8} M (**Figura E**) e adrenalina 10^{-3} M (**Figura F**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e os testes com adrenalina (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

130

Figura 39. Força de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle, lítio e rianodina após pausa de 5 minutos na estimulação, nos 3 diferentes regimes de alimentação: pós-absortivo (preto), pico de SDA (cinza escuro) e jejum (cinza claro). Os valores são media \pm EPM. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras maiúsculas indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas. As letras minúsculas indicam a diferença entre os grupos em mesma solução fisiológica. A ausência de símbolos indica que não foi registrada diferença entre os pontos (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

135

Figura 40. TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle, lítio e rianodina após pausa de 5 minutos na estimulação, nos 3 diferentes regimes de alimentação: Pós-absortivo (preto), Digestão (cinza escuro) e Jejum (cinza claro). Os valores são media \pm EPM. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras maiúsculas indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas. As letras minúsculas indicam a diferença entre os grupos em mesma solução fisiológica. A ausência de símbolos indica que não foi registrada diferença entre os pontos (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

136

Figura 41. THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle, lítio e rianodina após pausa de 5 minutos na

estimulação, nos 3 diferentes regimes de alimentação: Pós-absortivo (preto), Digestão (cinza escuro) e Jejum (cinza claro). Os valores são media \pm EPM. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras maiúsculas indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas. As letras minúsculas indicam a diferença entre os grupos em mesma solução fisiológica. A ausência de símbolos indica que não foi registrada diferença entre os pontos (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

137

Figura 42. Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle, lítio e rianodina após pausa de 5 minutos na estimulação, nos 3 diferentes regimes de alimentação: Pós-absortivo (preto), Digestão (cinza escuro) e Jejum (cinza claro). Os valores são media \pm EPM. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras maiúsculas indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas. As letras minúsculas indicam a diferença entre os grupos em mesma solução fisiológica. A ausência de símbolos indica que não foi registrada diferença entre os pontos (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

138

Figura 43. Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle, lítio e rianodina após pausa de 5 minutos na estimulação, nos 3 diferentes regimes de alimentação: Pós-absortivo (preto), Digestão (cinza escuro) e Jejum (cinza claro). Os valores são media \pm EPM. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras maiúsculas indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas. As letras minúsculas indicam a diferença entre os grupos em mesma solução fisiológica. A ausência de símbolos indica que não foi registrada diferença entre os pontos (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).....

139

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Espécie de estudo.

A palavra *Crotalus* deriva do latim *crotalum* que se refere a uma espécie de instrumento musical de percussão, semelhante a uma castanholinha ou maraca. Este grupo é constituído por cerca de 30 espécies, encontradas exclusivamente nas Américas e com ampla distribuição desde o Canadá até o norte da Argentina. O gênero *Crotalus* é representado no Brasil por uma única espécie, *Crotalus durissus*, que foi o modelo escolhido para as análises apresentadas neste estudo e cuja distribuição se estende da Argentina ao México. No Brasil, essa espécie apresenta uma ampla distribuição geográfica, habitando os cerrados do Brasil Central, as regiões áridas e semi-áridas do Nordeste, os campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte. Tem preferência pelas áreas secas e quentes, evitando a região de florestas e litoral (Fig. 1).



Figura 1: Cascavél sul-americana, *Crotalus durissus terrificus* e a área de incidência no Brasil (CARDOSO *et al.*, 2009)

Apesar de ser encontrada apenas uma espécie de cascavél nesta vasta extensão de território, são encontradas 5 subespécies no país, 3 das quais com ampla dispersão. A mais conhecida é a espécie do Sul, *Crotalus durissus terrificus*, que se estende pelo oeste até os campos do Mato Grosso, Rondônia, Amazonas e Pará. A forma nordestina, *Crotalus durissus cascavella*, é encontrada na caatinga e é mais robusta do que as outras subespécies chegando a medir mais de 1,60 m de comprimento. Em São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais, Distrito Federal e Goiás encontra-se a subespécie *Crotalus durissus collilineatus* e na savana de Roraima é encontrada *Crotalus durissus ruruima* cujo veneno apresenta peculiaridades farmacológicas e não é totalmente neutralizado pelos soros anticrotálicos produzidos no país. Por fim, a última subespécie é *Crotalus durissus marajoensis* que habita as áreas abertas da Ilha de Marajó, no Pará, sendo o grupo menos conhecido no país (VANZOLINI, 2002; CARDOSO *et al.*, 2009).

Apesar da subdivisão da espécie em 5 grupos, as cascavéis em geral são serpentes terrestres, robustas e consideradas pouco ágeis quando comparadas aos demais membros da família Viperidae. A característica principal da espécie é a presença de um pequeno guizo localizado na extremidade da cauda que é constituído de cápsulas secas formadas a cada troca de pele e que emite um som comparável ao de um chocalho quando agitado. Este ruído é utilizado para avisar a sua presença e espantar os animais que lhe poderiam fazer mal. A cultura popular diz que o número de cápsulas que compõem o guizo indica a idade deste animal. Entretanto, por ser formado de resíduos de pele que ficam retidos a cada muda do animal, o guizo indicaria apenas o número de trocas de pele realizado pelo animal ao longo da vida, o que pode variar muito durante o ano. Também é válido lembrar que, por ser uma estrutura frágil, o guizo é quebrado com frequência tornando inútil a utilização deste como fonte de qualquer informação a respeito da idade do animal encontrado.

Normalmente, as cascavéis possuem uma coloração amarronzada, de fundo castanho-claro e tonalidades variadas, fator que contribui muito para sua camuflagem. Outra característica marcante são as manchas dorsais losangulares marrons marginadas de branco ou amarelo. É

um animal de hábitos crepusculares e noturnos e sua dieta consiste basicamente de pequenos mamíferos. A captura do alimento se dá através da inoculação do veneno, capaz de produzir um efeito hemolítico e neurotóxico. O aparelho inoculador de veneno, formado por presas móveis e canaliculadas, é extremamente eficiente (VAN RIPER, 1953).

Entre a narina e o olho é possível notar a presença da fosseta loreal, órgão responsável pela percepção térmica do ambiente e muito utilizado para a localização de possíveis presas ou mesmo para a locomoção. Apesar de peçonhenta, não é um animal agressivo. A maioria dos acidentes crotálicos registrados em humanos ocorre devido à tentativa por parte da vítima de interação com o animal (normalmente o manuseio), ou por meio de uma aproximação acidental.

Pela sua ampla distribuição geográfica e seus hábitos de vida, a cascavél é um interessante modelo para estudar os efeitos dos extremos metabólicos sobre o funcionamento de órgãos e sistemas. Por serem animais típicos de regiões secas, as cascavéis enfrentam como desafios naturais a variação de temperatura e a disponibilidade de alimento. Em animais ectotérmicos, o metabolismo padrão está diretamente ligado à temperatura do meio, visto que estes não possuem a capacidade de manter constante a temperatura corpórea. Somado a isso, existe a baixa disponibilidade de alimento na época de estiagem. A alimentação de cascavéis é composta de pequenos roedores e aves, que normalmente migram durante a época de seca.

Sendo predador do tipo “senta e espera”, a baixa disponibilidade de presas no ambiente somada à alta temperatura, em média 30°C, que impossibilita a redução da taxa metabólica como forma de economizar energia, tornam a cascavél uma espécie interessante para estudo do jejum prolongado. Aparentemente, estes animais são bem adaptados a essa condição visto que têm uma lenta redução da massa corpórea e mesmo após um longo período em privação de alimento, ainda possuem a capacidade de realizar atividade e de ingerir/digerir novamente.

Somada a essa característica, as cascavéis possuem a capacidade de ingestão de grandes presas. Estudos com indivíduos selvagens mostraram a ingestão de presas de até 70% da sua massa corpórea (CLÉO LEITE, *dados não publicados*). Em laboratórios, é frequente a alimentação com

presas equivalentes a 30% da massa corpórea e o período de digestão é variável de acordo com o tamanho da presa, mas dura em média 15 dias (ANDRADE, 1997). Durante este período, a taxa metabólica destes animais aumenta cerca de 5 vezes o metabolismo padrão. Em contraste com essa condição, as cascavéis também apresentam a notável característica de passar longos períodos em jejum. Durante a época de estiagem de chuva no cerrado e caatinga é comum que roedores e aves migrem para outros ambientes, dificultando a obtenção de alimento. Dessa forma, animais como a cascavél devem apresentar ajustes fisiológicos que a permitam sobreviver a esta condição até que o alimento esteja novamente disponível.

Para resistir a extremos metabólicos como estes, o coração deve permanecer íntegro na sua capacidade contrátil e ser capaz de se ajustar à nova demanda metabólica. Em função disso, este trabalho buscou descrever e avaliar as alterações na função contrátil de cascavél sul-americana, *Crotalus durissus terrificus*, durante os extremos metabólicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, D.; CRUZ-NETO, A.; ABE, A.S. **Meal Size And Specific Dynamic Action In The Rattlesnake *Crotalus durissus* (Serpentes: Viperidae).** Herpetologica, 53(4): 485-493. 1997.
- CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; HUI WEN, F.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD Jr., V. **Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** 2^o Edição. Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda. 2009.
- VAN RIPER, W. **How a rattlesnake strikes.** Sci Amer, 189(4): 100-102. 1953.
- VANZOLINI, P. E.; CALLEFFO, M. E. **A taxonomic bibliography of the South American snakes of the *Crotalus durissus* complex (Serpentes, Viperidae).** Anais da Academia Brasileira de Ciências, 74(1): 37-83. 2002.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA DE CASCAVÉIS SUL- AMERICANA, *Crotalus durissus* *terrificus*

1. INTRODUÇÃO

Estrutura e função contrátil da fibra cardíaca.

A classe dos répteis é constituída por vertebrados tetrápodos e ectotérmicos que evoluíram dos anfíbios há 320 milhões de anos e foram os primeiros animais a habitar os ambientes secos. Hoje, a classe é representada por animais divididos em 4 ordens diferentes: Chelonia (tartarugas, cágados e jabotis), Squamata (anfísbênios, cobras e lagartos), Rhynchocephalia (tuatara) e a Ordem Crocodilia (crocodilos e jacarés). Apesar de amplo e diversificado, trata-se de um dos grupos menos estudados em diversos aspectos, dentre estes a função contrátil do miocárdio.

O débito cardíaco, produto direto da frequência e da força de contração, deve ser regulado a fim de que haja um fluxo sanguíneo apropriado para a execução do trabalho de todos os tecidos nas mais variáveis condições impostas pelo ambiente (TIBBITS *et al.*, 1992), principalmente em animais ectotérmicos, em que o equilíbrio homeostático sofre influência direta das oscilações ambientais. Segundo DRIEDZIC & GESSER (1994), o coração dos animais ectotérmicos enfrentam mudanças muito maiores do que as enfrentadas pelos animais endotérmicos, no que diz respeito ao conteúdo extracelular de gases, no equilíbrio ácido-base e na temperatura. E pode-se dizer que isto se deve às flutuações impostas pelo ambiente, hábito e à organização do sistema cardiovascular destes animais.

O conjunto de processos que ocorrem desde a despolarização da membrana do miócito até o manejo iônico, que culmina na interação entre actina e miosina durante a contração e no seu desacoplamento para o relaxamento, é denominado acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C). A compreensão dos mecanismos envolvidos no acoplamento E-C serve de base para o entendimento da estratégia utilizada para manter um débito cardíaco apropriado em cada uma das espécies (BERS, 1991).

O potencial de ação (PA) inicia-se com qualquer alteração elétrica na membrana celular que supere um limiar de ativação. Depois de gerado, este estímulo, auto renovável, se propaga por toda membrana celular do miócito, e através das junções comunicantes (junções GAP) é transmitido para os

miócitos adjacentes. Este PA percorre então a membrana de todos os miócitos cardíacos e ativa os canais de Na^+ e Ca^{2+} dependentes de voltagem por meio de uma alteração na sua conformação em função do potencial elétrico (BERS, 2000).

Os canais de Na^+ dependentes de voltagem podem ser encontrados em 3 estados diferentes de acordo com o potencial: em repouso, quando a face citosólica permanece fechada (-90 mV); ativado, quando face citosólica e extracelular são abertas durante a despolarização (entre -90 mV e +35 mV) e inativado, quando a face extracelular se fecha para a repolarização da membrana (+35 mV a -90 mV) (GUYTON & HALL, 2006). Por outro lado, o Ca^{2+} que promove a interação actino-miosínica, chamado de Ca^{2+} ativador, pode apresentar duas origens:

a) Meio extracelular: entra através da sarcolema, por meio dos canais dependentes de voltagem do tipo L (canais lentos) e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) em modo reverso;

b) Reservas internas: principalmente o retículo sarcoplasmático (RS).

Uma pequena quantidade de Ca^{2+} utilizado na contração celular pode ser originada da mitocôndria. Neste caso, o Ca^{2+} entra na organela por meio de um transportador *uniporter* de Ca^{2+} e sai da organela para auxiliar na contração por meio de um NCX mais lento do que o encontrado na sarcolema (BERS, 2008).

A contração do músculo cardíaco gera a força isométrica e o rápido encurtamento dos miofilamentos responsável pela ejeção de sangue. A geração de força pode ser alterada pela quantidade e duração do pulso de Ca^{2+} que interage com as proteínas contráteis no citosol, e o aumento ou redução da permeabilidade desse íon na membrana plasmática da célula cardíaca (BERS, 2002). O tempo de permanência do Ca^{2+} no citosol também pode sofrer influência da cinética deste íon e às rotas que ele pode adotar durante o ciclo de contração e relaxamento (BERS, 2002). Dessa forma, a quantidade de Ca^{2+} e o tempo que este íon permanece disponível para a interação actino-miosínica possuem papel fundamental em qualquer alteração na frequência cardíaca, ou mesmo, na força de contração (YUE, 1987).

A abertura dos canais lentos de Ca^{2+} é de grande importância para a contração do miócito cardíaco visto que estes não se fecham tão

rapidamente quanto os canais de Na^+ , prolongando o potencial de membrana positivo pelo influxo de Ca^+ e efluxo de K^+ da célula, causando o característico platô no PA da célula cardíaca (BERS, 2002). O NCX é outro componente fundamental para o acoplamento E-C, pois ele trabalha como uma bomba de íons com sistema contra-transporte reversível que bombeia 3 íons Na^+ pra dentro e 1 íon Ca^{2+} . A direção e amplitude do transporte por meio do NCX dependem do potencial de ação e das concentrações de íons Na^+ e Ca^{2+} intra e extracelular (BERS, 2000). A origem do Ca^{2+} ativador da contração resulta em importantes diferenças na produção de força, visto que pode influenciar a quantidade de Ca^{2+} livre que é liberada no citosol a cada ciclo cardíaco, além de influenciar o tempo em que o Ca^{2+} permanece livre no citosol, promovendo a interação actino-miosínica (BERS, 1991).

O retículo sarcoplasmático (RS) é um compartimento intracelular separado da sarcolema e com a função de armazenar e liberar íons Ca^{2+} para a contração do miócito, sendo que seu volume pode variar de acordo com a espécie ou tipo celular (BERS, 2000; DI MAIO & BLOCK, 2008). O estoque de Ca^{2+} no interior do RS se dá por meio do bombeamento do íon pela enzima Ca^{2+} ATPase presente na membrana do RS (SERCA – Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase). FABIATO (1983) propôs que, em mamíferos, o influxo transsarcolemal de cálcio, através do NCX e de canais tipo L, dispara a liberação de uma quantidade ainda maior deste íon do RS através de canais de cálcio denominados canais de rianodina (BERS, 1991). Este processo é denominado liberação de cálcio cálcio-induzida (ou calcium-induced calcium release - CICR).

Apesar do influxo de cálcio através dos canais L da sarcolema ser variável nas diferentes espécies de mamíferos, a maioria dos estudos indica que este é insuficiente para suportar a contração (BERS, 1991; CHAPMAN, 1983). Dessa forma, o cálcio liberado pelo RS é considerado principal responsável pela contração no coração de todos os mamíferos estudados (WIER, 1990).

Os principais mecanismos de remoção de Ca^{2+} são o NCX presente na sarcolema, trabalhando em seu modo normal, e a SERCA. Essas duas estruturas dividem a tarefa de retirada de cálcio de forma que ao final de cada contração muscular, a quantidade de Ca^{2+} bombeada para o meio

extracelular via NCX deve ser semelhante àquela armazenada pela Ca^{2+} -ATPase para o interior do RS (BERS, 2008).

No entanto, essa situação parece ser muito diferente da encontrada no coração dos vertebrados basais. Em função da grande variedade estrutural que estes animais apresentam, o sistema cardiovascular é caracterizado por uma imensa plasticidade funcional. A histologia miocárdica deste grupo apresenta uma grande variação entre a constituição e distribuição das diferentes camadas (esponjosa e compacta) e da circulação coronariana (TOTA *et al.*, 1983; DRIEDZIC, 1992; TOTA & GATUSO, 1996). Esta variação também é encontrada na ultraestrutura do miócito em relação ao desenvolvimento do RS, presença ou ausência de túbulos T e tamanho do miócito (TIBBITS *et al.*, 1992; VORNANEN *et al.*, 2002).

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

TIBBITS *et al.* (1991) sugeriram que no miocárdio de anfíbios, o cálcio liberado pelo RS não é significativo para a contração. Além disso, a ocorrência de CICR no ventrículo destes animais foi contestada (*apud* FABIATO, 1983). Essas informações são reforçadas pelo fato da contração ventricular em anfíbios ser relativamente insensível à rianodina (um alcalóide de origem vegetal que mantém os canais de cálcio do RS parcialmente abertos, prevenindo o acúmulo de Ca^{2+} em seu interior), mesmo em concentrações que comprovadamente neutralizam a atividade deste canal, quando os experimentos são conduzidos utilizando-se frequências estimulatórias e temperaturas dentro da faixa fisiológica (BERS, 1985).

A maioria dos peixes já estudados exibe grandes modificações no acoplamento E-C, sendo que a maior parte do Ca^{2+} ativador é proveniente do meio extracelular, através de correntes de Ca^{2+} pelos canais do tipo L e pelo NCX. Na maior parte destes animais, o RS não fornece uma quantidade significativa de Ca^{2+} para os processos contráteis sendo considerado, por este motivo, não funcional e sem importância para o acoplamento E-C (VORNANEN et al, 2002). O processo de relaxamento nos miócitos destes peixes é atribuído à saída do Ca^{2+} citosólico principalmente por ação da Ca^{2+} -ATPase sarcolemal e pelo NCX. Esta dinâmica de extrusão do íon Ca^{2+} implica em algumas mudanças importantes no processo de acoplamento E-C para os peixes em relação aos mamíferos (VORNANEN et al., 2002).

Apesar da grande variedade encontrada dentro da classe Reptilia, a maioria dos estudos relevantes foi conduzida com tartarugas dos gêneros *Chrysemys* e *Pseudemys*. A capacidade das mesmas de permanecer por prolongados períodos em anóxia e acidose foi amplamente estudada (GESSER & POUPA, 1983; FARREL et al., 1994; BAILEY & DRIEDZIC, 1996, 1997; SHI & JACKSON, 1997; HICKS & FARREL, 2000; NIELSEN & GESSER, 2001; KALININ & GESSER 2002), no entanto, pouca atenção foi dada ao acoplamento E-C e aos mecanismos que ditam a funcionalidade dos miócitos.

Alguns trabalhos se dedicaram ao estudo da ultraestrutura do tecido miocárdico de répteis. No miocárdio de jibóia, *Boa constrictor*, LEAK (1967) descreveu pequenas vesículas dispersas no sarcoplasma, mas não encontrou um RS complexo ao redor das miofibrilas. Células miocárdicas bem desenvolvidas foram descritas em iguanas do gênero *Anolis sp* (FORBES & SPERELAKIS, 1971). OKITA (1971) encontrou estruturas curtas semelhantes a túbulos T e RS bem desenvolvido em tartarugas do gênero *Amyda*. LEESON (1981) estudou a ultraestrutura do miocárdio de algumas serpentes e verificou a ausência de túbulos T, RS pobremente desenvolvido e, aparentemente, até mesmo ausente em algumas células. Tais achados sugerem que esta organela não seja funcional nestes animais.

GALLI et al. (2006), estudaram a função cardíaca da tartaruga americana, *Trachemys scripta*; da serpente píton, *Python regius*, do lagarto teiú, *Tupinambis merianae*, e do lagarto varanídeo, *Varanus exanthematicus*. Os autores verificaram que estes répteis recrutam o Ca^{2+} do RS para o

desenvolvimento de força de forma tecido-específica e frequência-específica. De uma forma geral, os efeitos da rianodina foram mais pronunciados no tecido atrial que no ventricular. No músculo ventricular, os autores verificaram efeitos significativos da rianodina apenas em pítons e lagartos varanídeos, nos quais a força contrátil foi significativamente reduzida em frequências fisiologicamente relevantes para essas espécies.

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

A diversidade morfofisiológica da célula cardíaca apresentada entre as classes de vertebrados, bem como as variações encontradas dentro de uma mesma classe, mostram quão diversos podem ter sido os caminhos evolutivos percorridos durante a formação de aparatos cardíacos que apresentam tais particularidades espécie-específicas (HICKMAN *et al.*, 2001). Apesar de todo o conhecimento acerca do acoplamento E-C, restam ainda grandes lacunas no conhecimento da fisiologia dos miócitos cardíacos dos vertebrados. Desta forma, o estudo da fisiologia de grupos ainda pouco explorados como os répteis é de fundamental importância neste contexto.

2. OBJETIVOS

Visto que pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contração de répteis, o presente trabalho buscou caracterizar a contratilidade miocárdica *in vitro* da Cascavel Sul-americana, *Crotalus durissus terrificus*.

Para tanto, tiras ventriculares de exemplares de cascavéis em situação controle (30 dias após a alimentação) foram utilizadas para a avaliação dos seguintes parâmetros:

1. Verificação da ocorrência ou não de deterioração da força de contração isométrica no tempo experimental determinado (40 min);
2. Análise dos possíveis efeitos do aumento da taxa de estimulação sobre a força de contração desenvolvida pelas tiras ventriculares e a relação desses resultados com o acoplamento excitação-contração;
3. Determinação indireta da importância do retículo sarcoplasmático como fornecedor de cálcio ao aparato contrátil, através da comparação da força de contração obtida na presença ou ausência de rianodina ou tapsigargina (bloqueadores dos canais de cálcio e da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático, respectivamente);
4. Determinação da capacidade de estoque intracelular de Ca^{2+} durante pausas diastólicas prolongadas (5 min), por meio da medida do desenvolvimento de força da primeira contração após o repouso;
5. Determinação da capacidade máxima de desenvolvimento de força pelo músculo cardíaco por meio da adição de adrenalina;
6. Verificação da importância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) no manejo de cálcio da espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Preparações experimentais.

Os exemplares de cascavel, *Crotalus durissus terrificus* (n = 8, 650,83 ± 71,96 g) foram cedidos pelo Jacarezário do Departamento de Zoologia da UNESP, *campus* de Rio Claro, SP e transportados, cerca de 7 dias antes da realização dos experimentos, até o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da UFSCar. Neste local, os animais foram mantidos em condições similares as de origem, compartimentos individualizados, temperatura média de 30 ± 2°C e fotoperíodo natural, além de constante disponibilidade de água. A alimentação consistiu de ratos da linhagem Wistar com peso equivalente a 30% da massa da serpente. A última alimentação de cada animal utilizado ocorreu cerca de 30 dias antes da experimentação.

As preparações experimentais foram efetuadas de acordo com os procedimentos adotados por Kalinin & Gesser (2002) e Thomaz *et al.* (2009), descritos a seguir. Os animais foram pesados e, em seguida, sacrificados por decapitação. O coração foi retirado, pesado e colocado em solução fisiológica gelada, própria para répteis, com a seguinte composição: 115 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂ e 5 mM glicose. A solução foi prévia e continuamente borbulhada com uma mistura carbogênica contendo 98% O₂ e 2 % CO₂.

Em todos os protocolos experimentais, foram utilizadas tiras ventriculares (diâmetro de 1 a 2 mm) obtidas do coração de um único animal. Em seguida, cada tira foi colocada individualmente em cubetas contendo 30 mL de solução fisiológica termostaticada a 30°C, dotada de borbulhamento constante com a mistura carbogênica descrita acima. Uma extremidade da tira foi fixada a um pequeno gancho presente na parte terminal de um eletrodo de estimulação de platina e a outra conectada a um transdutor de força isométrica LETICA (LETICA Scientific Instruments, Barcelona, Espanha), ligado a um amplificador (AECAD 04; Solução Integrada Ltda., SP) e a um sistema informatizado (AQCAD 1.5.5 e ANCAD; Solução Integrada Ltda., SP), para obtenção do traçado da contração isométrica para posterior análise.

Os eletrodos de estimulação foram acoplados a estimuladores AVS 100D (Solução Integrada Ltda., São Paulo, SP) que geram pulsos elétricos quadrados de 8ms de duração e voltagem suficiente para que o limiar de resposta mecânica seja atingido. Esses estimuladores possuem as mesmas especificações eletrônicas dos Grass SD9 (Quincy, Mass. USA). A Figura 3 mostra o set experimental utilizado para a obtenção dos resultados.

As tiras ventriculares foram estimuladas eletricamente na frequência de 0,2Hz, sendo que, durante a estabilização (~ 90min), as tiras sofreram estiramento para a obtenção de melhor relação comprimento/desenvolvimento de força (detalhes em RIVAROLI *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2006, 2007). Após estabilização, os diferentes protocolos experimentais foram iniciados, para as medidas da força de contração (Fc) e dos parâmetros tempo-dependentes (tempos para o pico máximo de força - TPT e para 50% do relaxamento - THR) e velocidade (taxa de contração e taxa de relaxamento) (Fig. 1). Todos os protocolos foram desenvolvidos à temperatura constante de 30°C

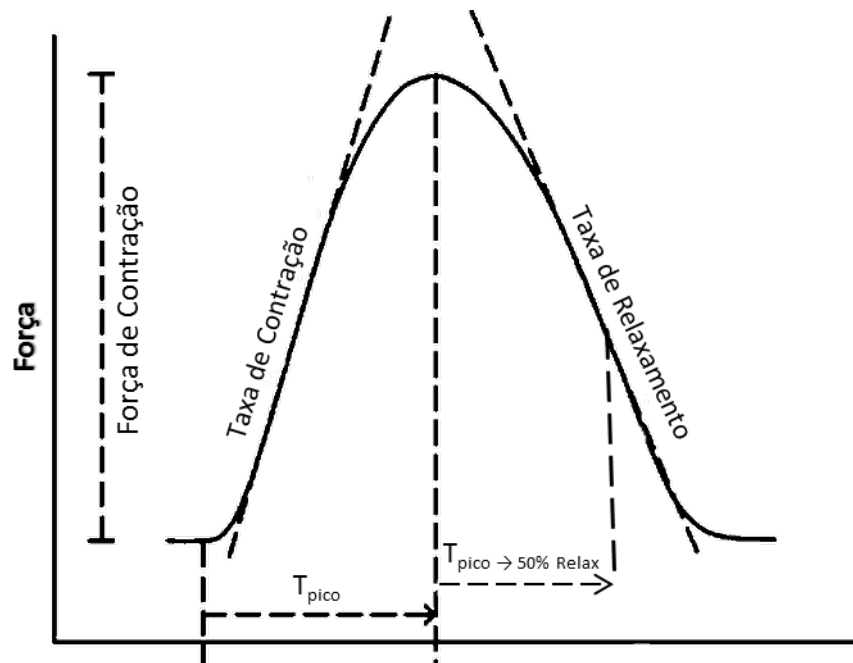


Figura 1. Esquema ilustrativo dos parâmetros contráteis avaliados em cada protocolo.



Figura 2. Set experimental utilizado para a obtenção dos registros da contração isométrica das tiras ventriculares de cascavéis: **A.** cilindro de mistura carbogênica; **B.** banho termostatizado; **C.** amplificador de força; **D.** estimuladores elétricos; **E.** banho com quatro cubetas; **F.** sistema informatizado com placa de aquisição e tratamento dos dados.

3.2. Protocolos experimentais.

3.2.1. Efeito do tempo experimental.

Após a estabilização as tiras ventriculares foram mantidas a 0,2 Hz (12 bpm), por um período de 40 minutos onde a força de contração (F_c) foi registrada ininterruptamente para certificação de que no tempo experimental não haveria nenhuma deterioração da mesma ou qualquer alterações na dinâmica contrátil do miocárdio.

3.2.2. Tensão pós-pausa

Para verificar a capacidade de armazenamento intracelular de cálcio durante um período de repouso, as tiras foram submetidas a uma pausa de 5 minutos na estimulação. Após este período, as tiras foram novamente estimuladas e a primeira contração foi registrada para verificar a presença ou ausência de potenciação ou decaimento na F_c .

3.2.3. Aumento da frequência de estimulação.

Este protocolo foi realizado com o objetivo de determinar a capacidade do miocárdio do animal em manter o acoplamento E-C frente a incrementos da frequência cardíaca a diferentes temperaturas.

Após a estabilização das tiras ventriculares a 0,2 Hz, foram efetuados os registros do desenvolvimento de força isométrica (F_c) e dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) por 5 minutos. Ao final desse tempo, as taxas de estimulação foram progressivamente aumentadas até que os registros se tornassem irregulares. Foi considerada máxima a frequência de estimulação na qual pelo menos 80% das tiras foram capazes de se contrair regularmente.

3.2.4. Papel do cálcio extracelular.

Buscando verificar a dependência da contratilidade em relação ao cálcio extracelular, após a estabilização, as tiras ventriculares foram submetidas a um aumento na oferta de Ca^{2+} presente na solução fisiológica. Foi realizado um registro da F_c e dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) em solução fisiológica controle contendo 2 mM de cálcio. A partir de então, a cada 15 minutos, acrescentou-se 2 mM de cálcio em cada cubeta para que as concentrações de 4, 6, 8 e 10 mM de cálcio fossem atingidas. Em cada concentração, os registros de força foram efetuados como descrito anteriormente.

3.2.5. Papel do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX).

Para verificar-se a importância do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX) na contratilidade miocárdica, o NaCl contido na solução fisiológica comum foi substituído por LiCl. As tiras ventriculares foram mantidas em solução controle e, após o término da estabilização, a solução presente nas cubetas foi trocada pela solução contendo Li^+ . Foi aguardado cerca de 10 minutos antes do início dos registros para garantir a difusão do íon e assegurar o bloqueio do NCX. Este tempo foi suficiente para que a força de contração se estabilizasse novamente. Após a troca de solução, foi registrada a primeira contração após uma pausa de 5min na estimulação das tiras e em seguida, a contração foi

avaliada em frequências de estimulação crescentes, de 0,2 em 0,2 Hz, até que os registros de força se tornassem irregulares.

3.2.6. Efeito da adrenalina.

A adrenalina foi utilizada para verificar a capacidade máxima de desenvolvimento de força pelo músculo cardíaco. Para esta investigação foram utilizadas concentrações crescentes de adrenalina (Sigma®) adicionadas à solução fisiológica de cada cubeta visando atingir as concentrações finais de 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M e 10^{-3} M. Tais incrementos na concentração de adrenalina foram realizados no intuito de simular uma situação de estimulação adrenérgica máxima. Após a adição de adrenalina, esperou-se cerca de 3 minutos para a sua difusão completa na solução e a partir de então foi feito o registro de Fc, TPT e THR. Este tempo foi suficiente para estabilização da força de contração no novo patamar.

O efeito da adrenalina sobre a Fc também foi investigado durante os incrementos na frequência de estimulação, conforme descrito no item 3.3.5. Os parâmetros assim obtidos foram comparados aos dados da mesma tira antes da adição de adrenalina.

3.2.7. Efeito da Rianodina.

A funcionalidade do retículo sarcoplasmático (RS) foi testada por meio da adição de 10 μ M de rianodina (inibidora de canais de Ca^{2+} do RS) à solução fisiológica contida em cada cubeta. Esperou-se de 10 minutos para a sua difusão completa na solução, tempo suficiente para estabilização da força de contração no novo patamar. Após esse tempo foram obtidos os parâmetros contrateis após pausa estimulatória de 5 minutos e em frequências crescentes de estimulação, de 0,2 em 0,2 Hz até que os registros de Fc se tornassem irregulares.

3.3. Forma de Apresentação e Tratamento Estatístico dos Resultados.

Os gráficos iniciais mostram os dados brutos de força de contração ($\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$), TPT (ms), THR (ms), taxa de contração e relaxamento (mN/ms). A partir do teste de Rianodina, os dados estão ilustrados em porcentagem para melhor visualização do efeito da adição dos fármacos sobre a função cardíaca.

Os seguintes procedimentos estatísticos foram adotados para a análise dos dados obtidos no presente estudo, utilizando-se o programa Sigmaplot (Versão 11.0, Systat Software, Inc):

- Análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para verificar a existência de possíveis variações entre os valores na análise de efeito do tempo experimental e alterações em função da adição dos fármacos. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de p foram $<0,05$.
- ANOVA Two-way seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, para verificar a existência de possíveis variações em decorrência da exposição às drogas testadas. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de p foram $<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tempo

O teste para averiguar o efeito do tempo na capacidade contrátil das tiras ventriculares foi realizado para assegurar que, durante todo o período experimental, não há redução da capacidade contrátil. Essa é uma análise importante para validar o método utilizado, mostrando que qualquer efeito de aumento ou redução na função contrátil da fibra cardíaca acontece em função do protocolo aplicado e não por uma possível degradação celular em função do tempo de experimento.

Ao longo de 40 minutos, não foi observada qualquer deterioração no funcionamento da tira, como ilustrado no gráfico de força de contração (Fig. 3). A média de valores de Fc se manteve em $10,23 \pm 1,77$ mN/mm² ao longo de todo período testado. Os parâmetros de tempo, TPT e THR, também se mantiveram inalterados durante o período registrado, sendo obtida uma média de $532,43 \pm 16,12$ ms e $332,40 \pm 13,67$ ms, respectivamente (Fig. 4 e 5).

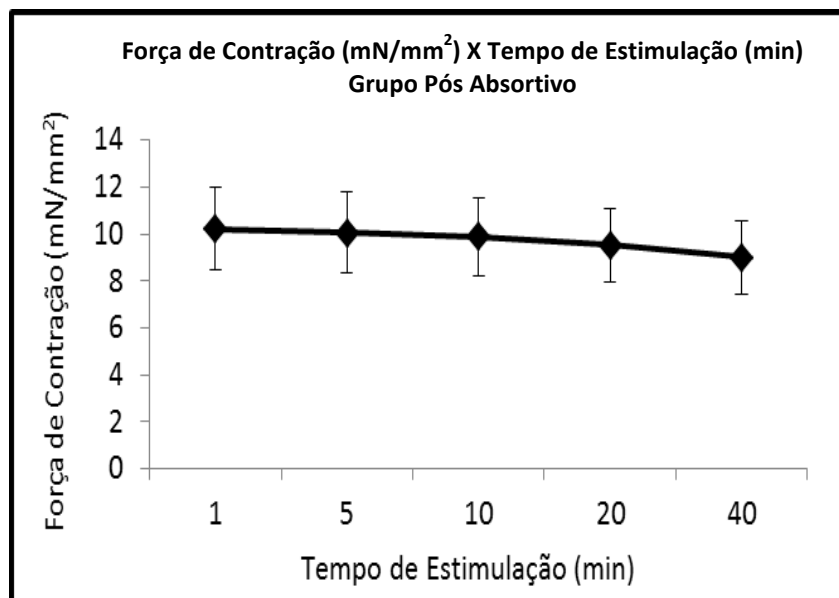


Figura 3. Efeito do tempo de experimentação sobre a força de contração de tiras ventriculares de cascavel. Período de registro de 40 minutos (ANOVA OneWay, $p < 0,05$). Os pontos são média \pm EPM.

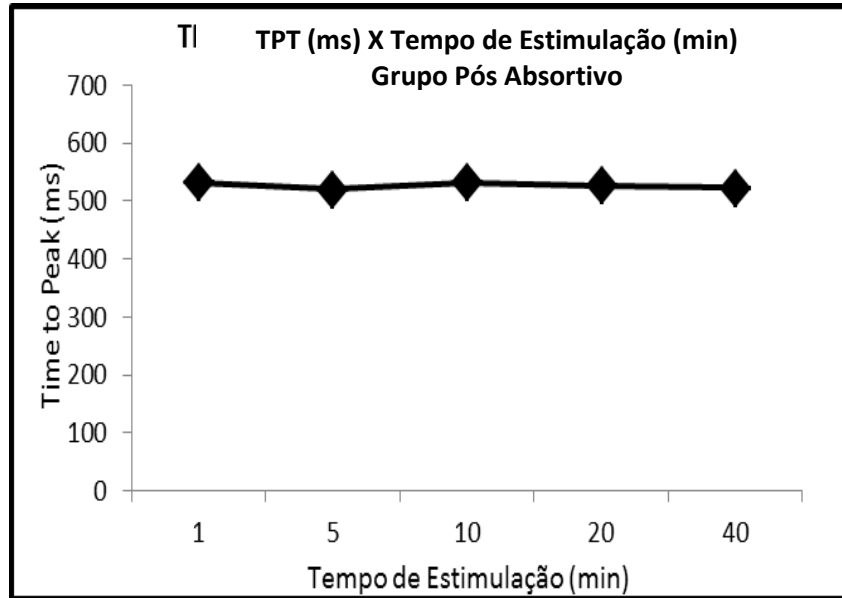


Figura 4. Efeito do tempo de experimentação sobre o TPT de tiras ventriculares de cascavel sul americana. Período de registro de 40 minutos (ANOVA OneWay, $p < 0,05$). Os pontos são media \pm EPM.

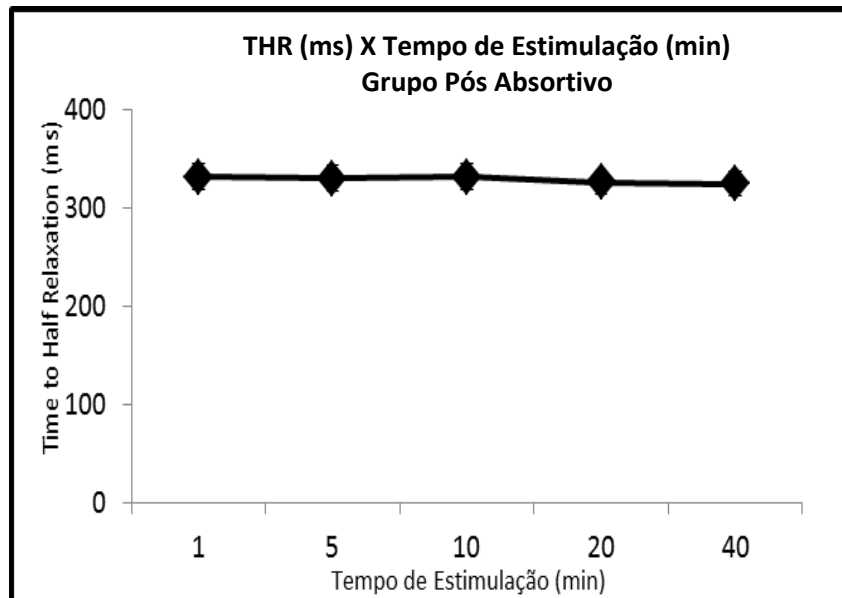


Figura 5. Efeito do tempo de experimentação sobre o THR de tiras ventriculares de cascavel sul-americana. Período de registro de 40 minutos (ANOVA OneWay, $p < 0,05$). Os pontos são media \pm EPM.

4.2. Relação Força-Frequência: Comparação entre Força da Base e do Ápice ventricular.

Durante os experimentos percebeu-se uma significativa variação entre os valores de força de contração (mN/mm^2) entre tiras de um mesmo coração (Fig. 6). Essa diferença interferia diretamente na análise de efeito das drogas testadas e bloqueio de canais em função grande variação dos dados. O aumento do número de amostras não acarretou redução em tal variação. Com base nestes dados, levantou-se a hipótese de que diferentes regiões do ventrículo poderiam ser capazes de desenvolver forças de contração distintas.

Em função da anatomia do coração dos répteis Squamata e a dificuldade de identificação das câmaras ventriculares, optou-se por dividir o ventrículo em duas partes: “próxima ao ápice” e “próxima à base” ventricular. Sendo assim, constatou-se que a força de contração gerada pelas tiras da base ventricular ($16,42 \pm 2,15 \text{ mN/mm}^2$) são significativamente maiores do que a gerada pelas tiras do ápice ($6,08 \pm 1,51 \text{ mN/mm}^2$) na frequência inicial testada experimentalmente de 0,2 Hz ou 12 bpm. Estes valores são semelhantes aos registrados inicialmente pela variação de “maiores” ($15,28 \pm 0,78 \text{ mN/mm}^2$) e “menores” ($6,44 \pm 0,50 \text{ mN/mm}^2$) forças e por isso foi possível associar estes dados com os de ápice e base ventricular. O aumento na frequência de estimulação causou um efeito escada negativo, com uma gradual redução na força de contração em ambas as regiões do ventrículo.

O tempo para o pico de força (TPT) não foi diferente nas duas regiões do ventrículo, sendo que as tiras da base atingiram o pico em $593,21 \pm 9,98 \text{ ms}$, enquanto tiras do ápice o fizeram em $602,65 \pm 30,05 \text{ ms}$. O aumento gradual na frequência de estimulação resultou em uma crescente redução no TPT em ambos os grupos. No entanto, a força de contração gerada na base é significativamente maior do que a obtida no ápice, enquanto o tempo gasto para atingir o pico é o mesmo em ambas (Fig. 7). Esta mesma situação é observada na análise do tempo para 50% do relaxamento (THR). As tiras da base ventricular atingiram o ponto de metade do relaxamento em $340,07 \pm 6,91 \text{ ms}$ e as tiras do ápice em $394,05 \pm 6,05 \text{ ms}$ (Fig. 8). Além de desenvolverem menor tensão, as tiras do ápice também levam um tempo significativamente maior do que as tiras da base para atingir o ponto de metade

do relaxamento entre as frequências de 0,2 e 1,0Hz. O efeito de escada negativo também foi registrado, com a redução gradual no THR durante o aumento nas frequências de estimulação.

A diferença na capacidade de geração de força somada a semelhança nos parâmetros de tempo, sugerem que a velocidade de conclusão do ciclo de contração em tiras ventriculares da base e do ápice são diferentes entre si (Fig. 9 e 10). Foi registrado que a velocidade de contração e relaxamento das tiras do ápice é significativamente menor do que a registrada em tiras da base. O aumento da frequência de estimulação mantém a velocidade do ciclo praticamente constante, sendo que a redução dos valores só é significativa na frequência máxima de 2,0Hz nas tiras da base. Em tiras do ápice, o aumento na frequência de estimulação não altera a velocidade do ciclo, sendo que não é observada diferença significativa em relação ao valor inicial (Fig. 9 e 10).

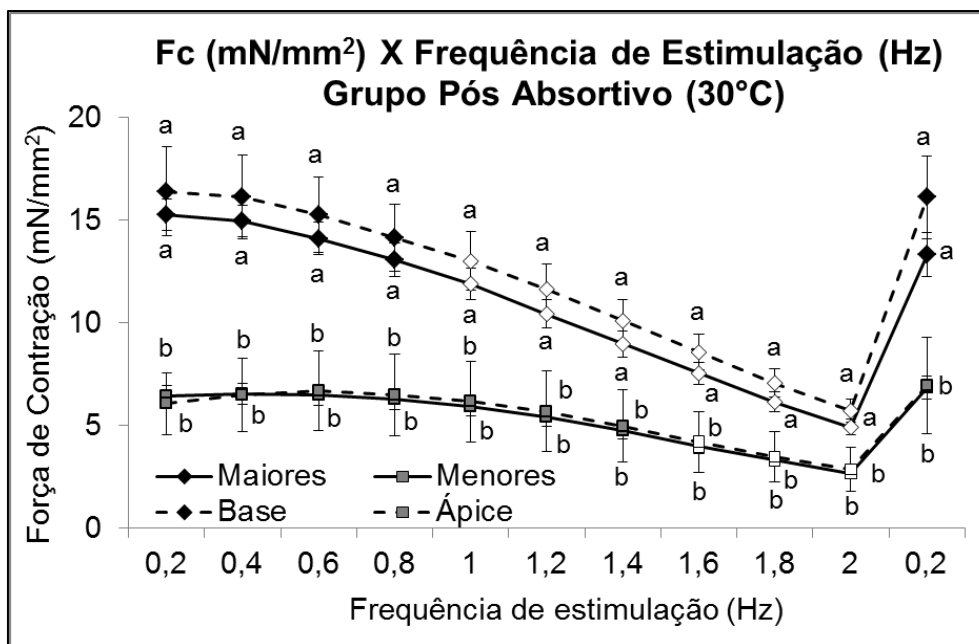


Figura 6. Forças de contração registradas em tiras ventriculares de ápice (n=24; Ápice - □ linha pontilhada) e base (n=21; Base - ◇ linha pontilhada) ventricular e grupos de tiras com maiores (n=10; Maiores - ◇ linha contínua) e menores (n=8; Menores - □ linha contínua) forças de contração (mN/mm²), em *C. durissus* durante o contínuo aumento na frequência de estimulação. Os valores são média ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

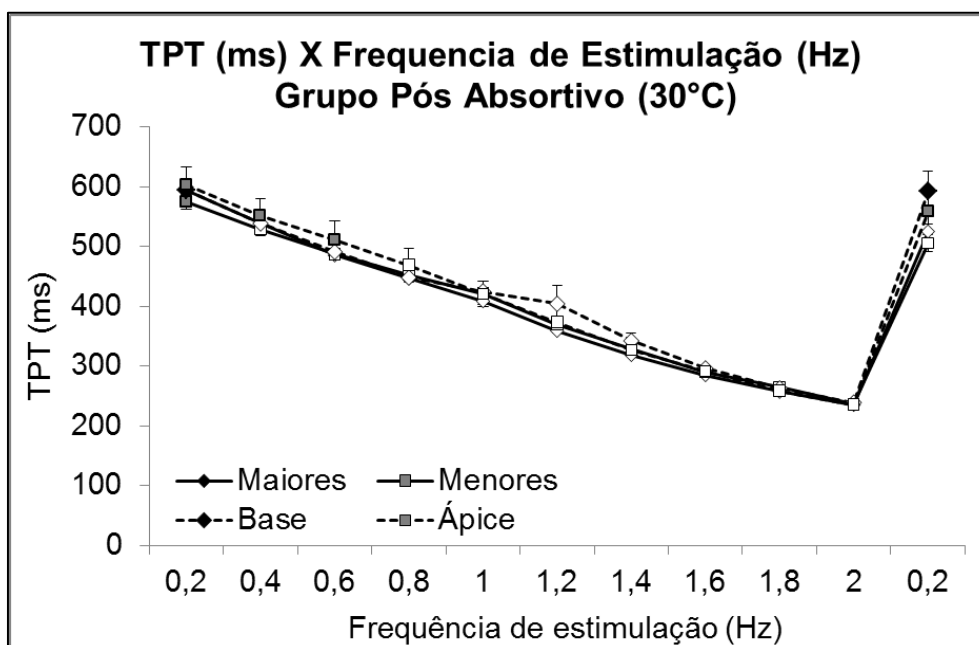


Figura 7. Alteração de TPT (ms) registradas em tiras ventriculares de ápice (n=24; Ápice - □ linha pontilhada) e base (n=21; Base - ◇ linha pontilhada) ventricular e grupos de tiras com maiores (n=10; Maiores - ◇ linha contínua) e menores (n=8; Menores - □ linha contínua) forças de contração (mN/mm²), em *C. durissus* durante o contínuo aumento na frequência de estimulação. Os valores são média ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

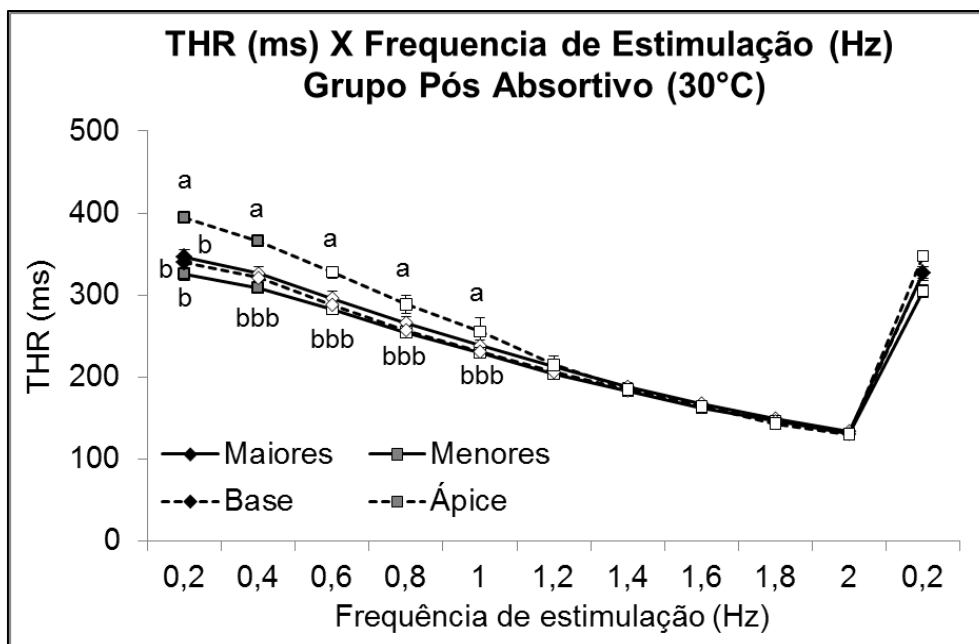


Figura 8. Alteração de THR (ms) registradas em tiras ventriculares de ápice (n=24; Ápice - □ linha pontilhada) e base (n=21; Base - ◇ linha pontilhada) ventricular e grupos de tiras com maiores (n=10; Maiores - ◇ linha contínua) e menores (n=8; Menores - □ linha contínua) forças de contração (mN/mm²), em *C. durissus* durante o contínuo aumento na frequência de estimulação. Os valores são media ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

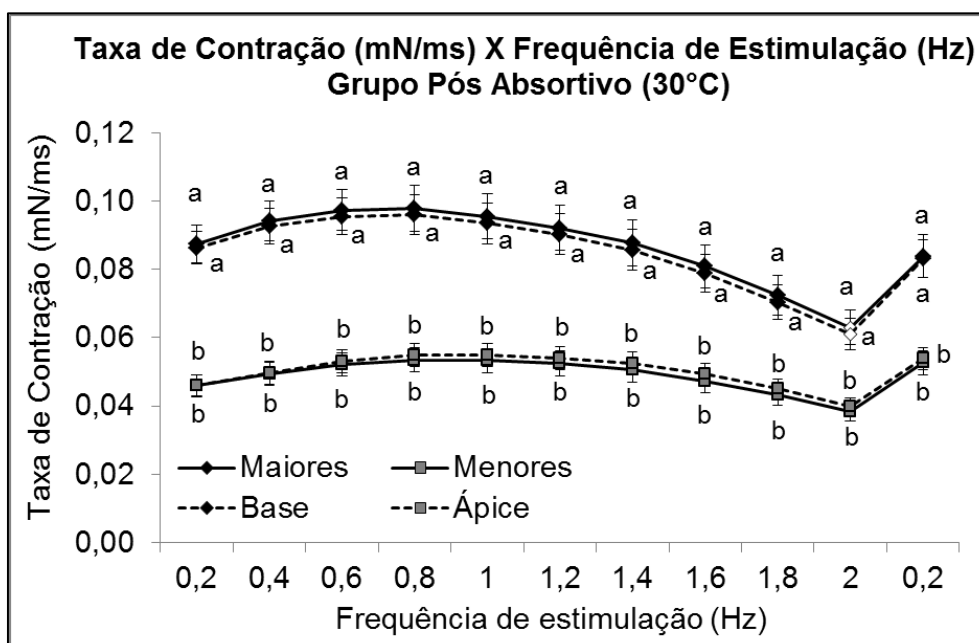


Figura 9. Alteração da Taxa de Contração (mN/ms) registradas em tiras ventriculares de ápice (n=24; Ápice - □ linha pontilhada) e base (n=21; Base - ◇ linha pontilhada) ventricular e grupos de tiras com maiores (n=10; Maiores - ◇ linha contínua) e menores (n=8; Menores - □ linha contínua) forças de contração (mN/mm²), em *C. durissus* durante o contínuo aumento na frequência de estimulação. Os valores são media ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

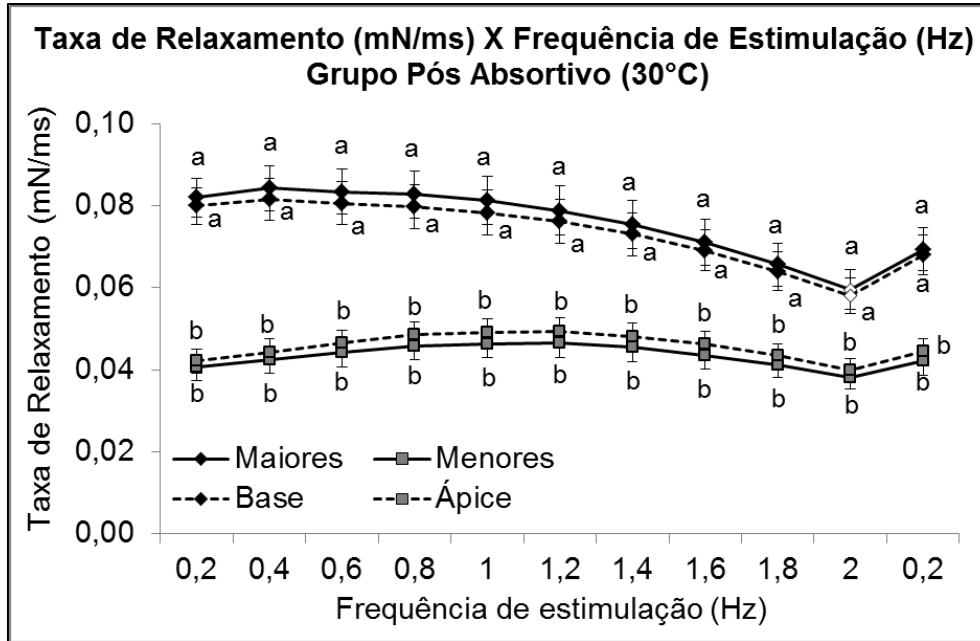


Figura 10. Alteração da Taxa de Relaxamento (mN/ms) registradas em tiras ventriculares de ápice (n=24; Ápice - □ linha pontilhada) e base (n=21; Base - ◇ linha pontilhada) ventricular e grupos de tiras com maiores (n=10; Maiores - ◇ linha contínua) e menores (n=8; Menores - □ linha contínua) forças de contração (mN/mm²), em *C. durissus* durante o contínuo aumento na frequência de estimulação. Os valores são média ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

4.3. Participação do Retículo Sarcoplasmático no Ciclo Cardíaco:

Em função da diferença nos valores de força registrados para tiras do ápice e base ventricular, os testes de bloqueio de canais, estimulação adrenérgica e dependência do cálcio extracelular foram analisados em porcentagem e não em valores brutos, como descritos no tópico anterior.

Após a exposição das preparações à rianodina, observou-se uma redução na força de contração de cerca de 40%, mostrando que o retículo sarcoplasmático tem uma importante participação no fornecimento de cálcio para a contração ventricular destes animais. Esta diminuição na capacidade contrátil esteve presente em todas as frequências testadas experimentalmente. Com o aumento da frequência de estimulação, houve também uma redução na geração de tensão partir da frequência de 1,4Hz quando comparado ao valor inicial (Fig. 11).

Além da redução na força de contração após o bloqueio do RS, o TPT das tiras expostas à rianodina foi maior do que o registrado em solução controle até a frequência de 1,0Hz. Em frequências maiores do que esta, os valores se igualaram ao controle (Fig. 12). O THR, por sua vez, é menor após a exposição à rianodina nas duas primeiras frequências (0,2 e 0,4Hz), igualando-se ao controle nas demais frequências testadas (Fig. 13).

Além de exercer uma importante influência no fornecimento de cálcio para a geração de força, o RS também é responsável pelo fornecimento e retirada rápida de cálcio da célula. Quando bloqueado, as taxas de contração e relaxamento reduziram-se cerca de 40%, indicando que a velocidade da ciclagem de cálcio fica prejudicada com a exposição à rianodina (Fig. 14 e 15).

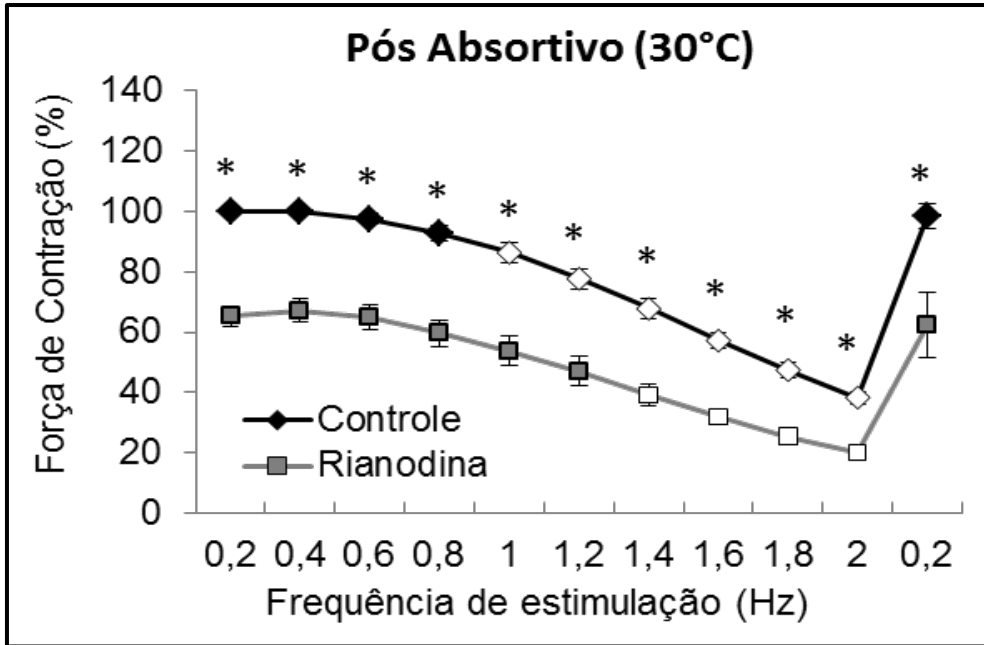


Figura 11. Relação força-frequência (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle –◆) e com rianodina (Rianodina –◻). Os valores são média ± EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

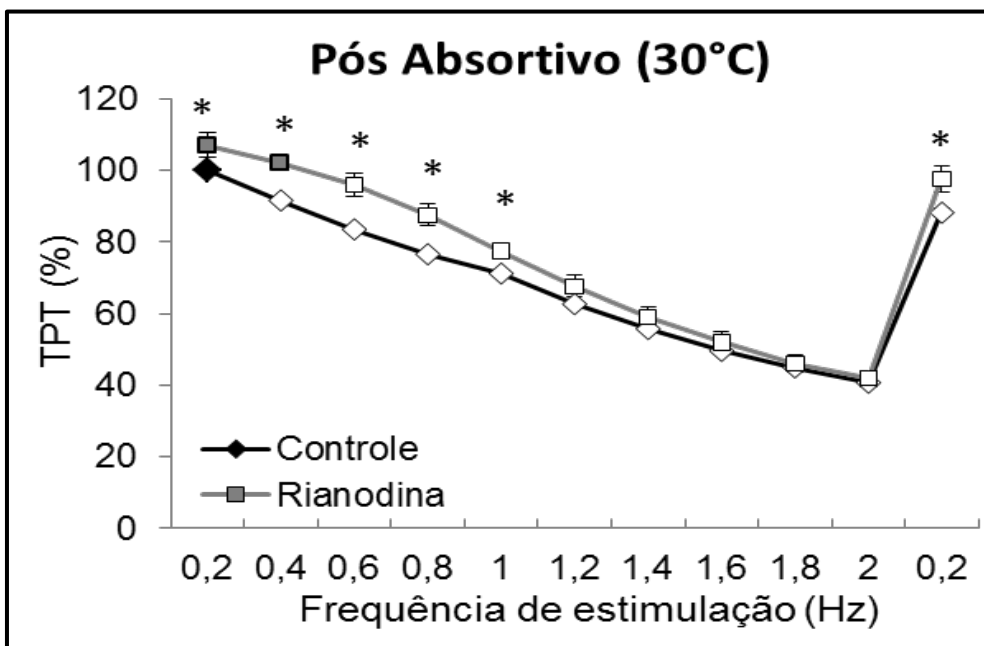


Figura 12. Valores de TPT (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle –◆) e com rianodina (Rianodina –◻). Os valores são média ± EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

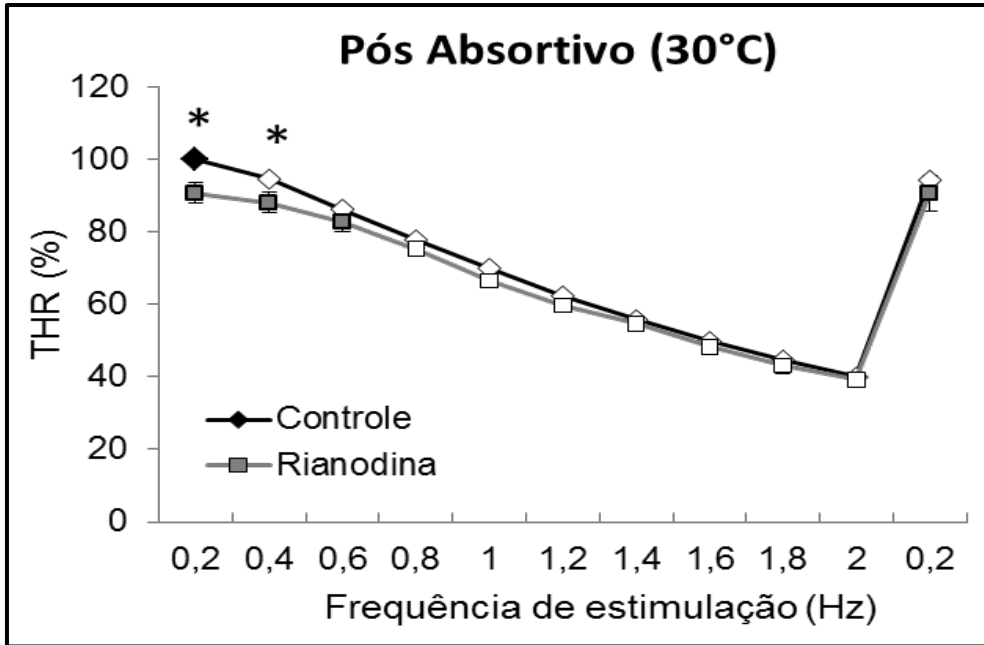


Figura 13. Valores de THR (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond) e com rianodina (Rianodina \square). Os valores são média \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

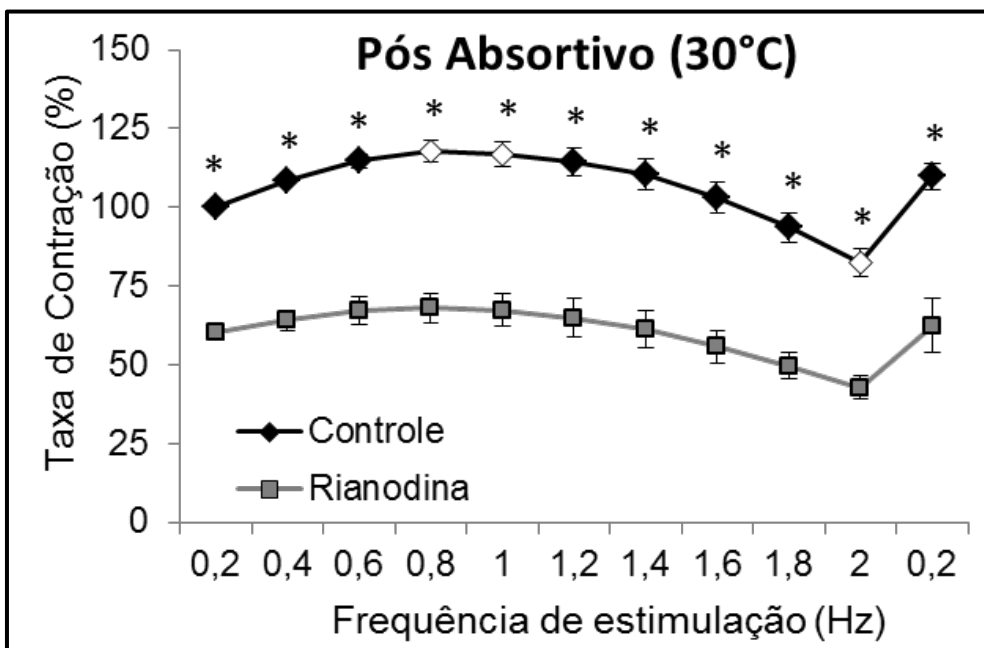


Figura 14. Valores de Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond) e com rianodina (Rianodina \square). Os valores são média \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

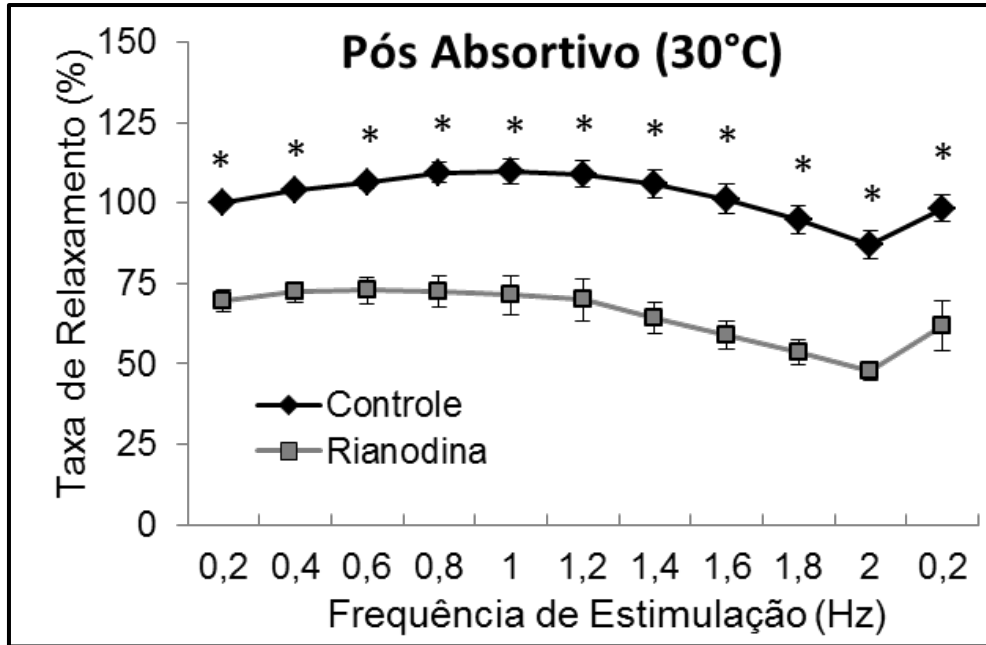


Figura 15. Valores de Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle –◇) e com rianodina (Rianodina –□). Os valores são média ± EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

4.4. Importância do NCX na Ciclagem de Cálcio:

A importância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) foi avaliada por meio da substituição do NaCl pelo LiCl, em igual concentração, na solução fisiológica utilizada durante os experimentos. Funcionalmente, o NCX é considerado cataliticamente inerte a cátions monovalentes inorgânicos, como o Li^+ , que é frequentemente utilizado em soluções livres de sódio para estudar a atividade do NCX (PALTY *et al.*, 2004). Como resultado do bloqueio do NCX, observou-se que as tiras ventriculares expostas a este tratamento apresentaram uma redução da capacidade de geração força de cerca de 20% quando comparada aos valores obtidos em solução controle (Fig. 16). Além disso, em altas frequências de estimulação as tiras perderam a capacidade de se contrair de forma regularmente mais precocemente, não resistindo a frequências além de 0,8Hz.

Também foi registrada uma redução do TPT de cerca de 20% na frequência inicial de 0,2 Hz (Fig. 17), no entanto, não foi registrada alteração no THR em relação aos valores obtidos em solução controle (Fig.18). A velocidade de contração reduziu ~20% após a frequência de 0,4 Hz em relação ao controle (Fig. 19), enquanto a velocidade de relaxamento reduziu 40% da já na frequência inicial de 0,2Hz (Fig. 20).

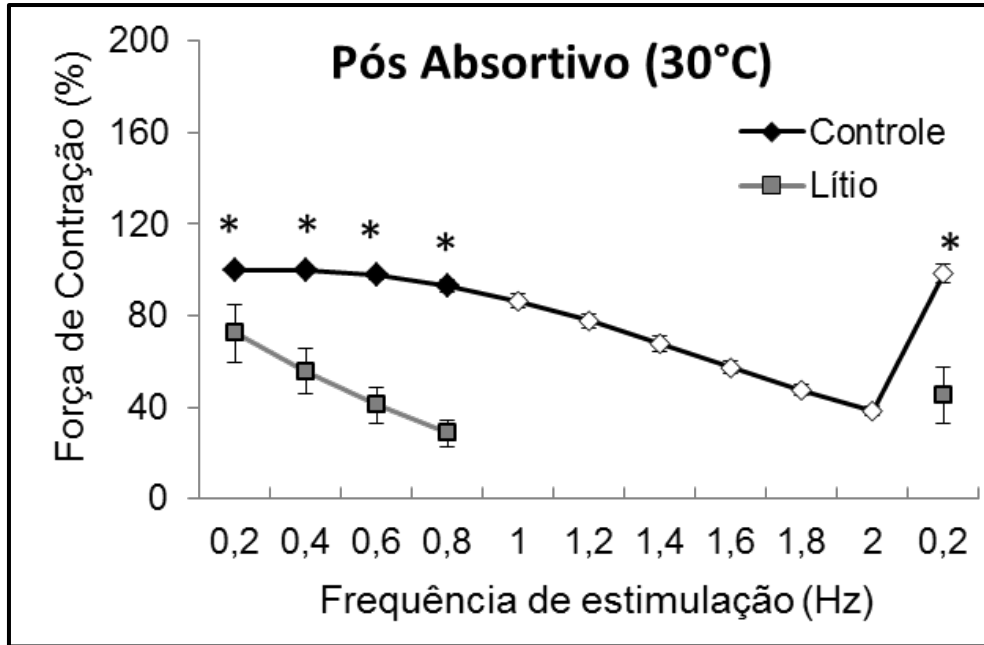


Figura 16. Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond) e com LiCl (Lítio \square). Os valores são média \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

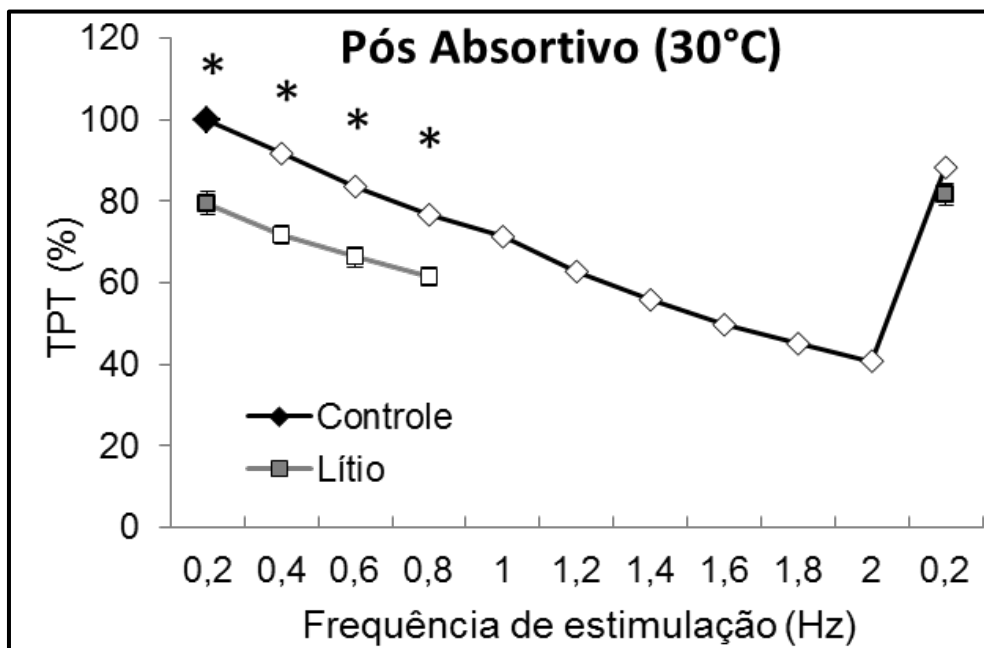


Figura 17. Alteração de TPT (%) em crescentes frequências de estimulação de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond) e com LiCl (Lítio \square). Os valores são média \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

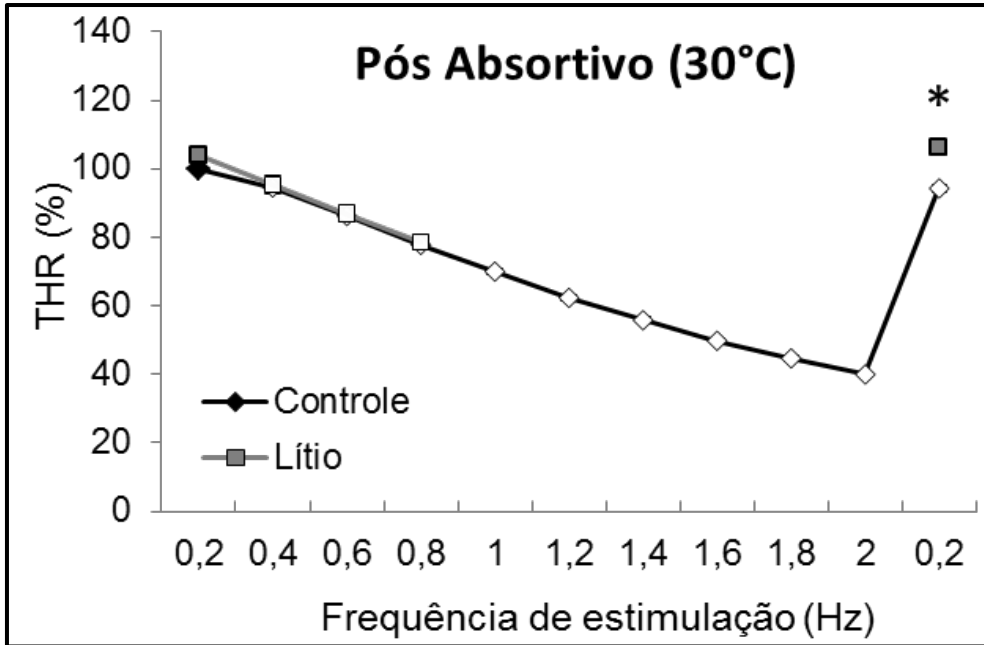


Figura 18. Alteração de THR (%) em crescentes frequências de estimulação de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond) e com LiCl (Lítio \square). Os valores são média \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

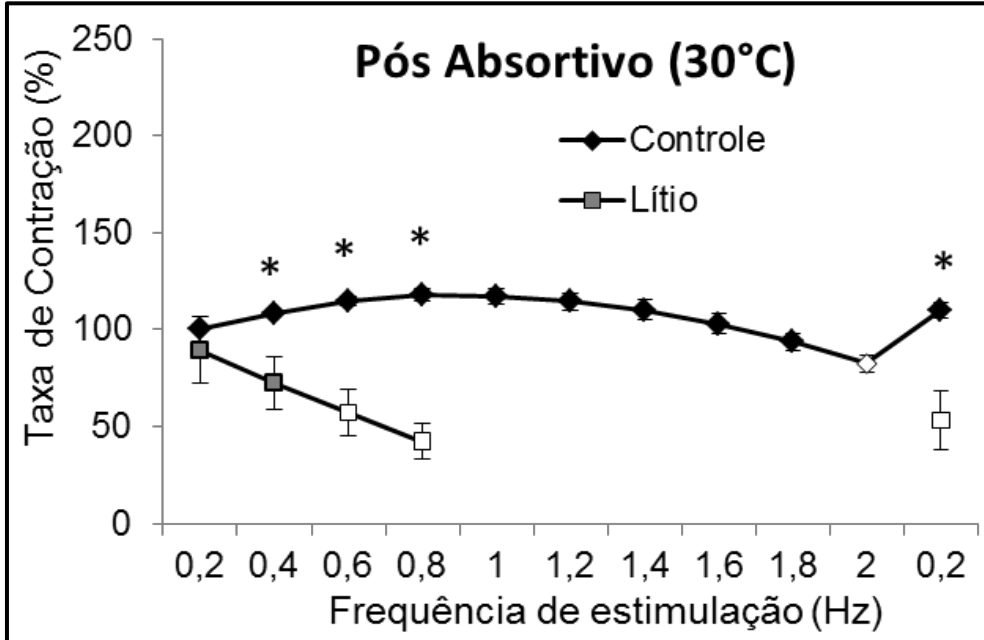


Figura 19. Alteração de Taxa de Contração (%) em crescentes frequências de estimulação de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond) e com LiCl (Lítio \square). Os valores são média \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

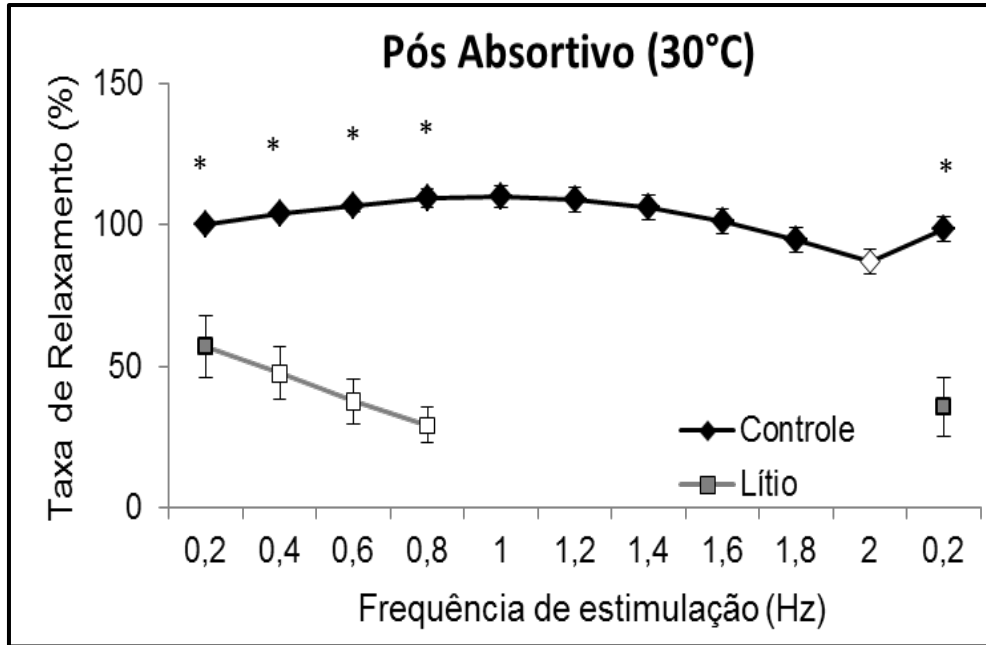


Figura 20. Alteração de Taxa de Contração (%) em crescentes frequências de estimulação de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle -◆) e com LiCl (Lítio -◻). Os valores são media \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

4.5. Importância do Cálcio Extracelular:

Para testar a importância do cálcio extracelular para a contração do miócito ventricular de cascavéis, foram adicionadas concentrações crescentes de cálcio na solução fisiológica. Com isso, foi possível observar um aumento significativo na força de contração de 55% com a concentração de 4 mM de Cálcio. O ponto máximo de força foi registrado na concentração de 6 mM de cálcio, o que elevou a Fc em 70% em relação aos valores registrados na solução inicial com 2 mM de cálcio (Fig. 21). Em concentrações maiores do que esta, a força se manteve constante.

Durante os incrementos de cálcio, o TPT se mantém constante até a concentração de 6 mM. A concentração de cálcio de 8 mM causou uma redução de 10% no TPT, o qual manteve-se neste novo valor durante os incrementos de cálcio subsequentes (Fig. 22). O THR apresentou um aumento de 15% a partir de 4 mM de cálcio e manteve-se constante nas concentrações mais elevadas (Fig. 23). Esse aumento pode ocorrer pela dificuldade de bombeamento de cálcio para fora do citosol pela diferença de concentração de cálcio entre o meio interno e externo. Como a concentração externa de cálcio é muito alta, o cálcio tende a demorar mais para sair da célula, dificultando o relaxamento.

A velocidade de contração e relaxamento também foi alterada pelo aumento da disponibilidade de cálcio na solução fisiológica. Foi observado um aumento na taxa de contração de cerca de 70% já na concentração de 4 mM, que foi mantido nas demais concentrações testadas (Fig. 24). A velocidade de relaxamento também aumentou cerca de 40% com o aumento da disponibilidade de cálcio já na primeira concentração testada. No entanto, esse aumento foi mantido apenas até a concentração de 8 mM, sendo que em 10mM a velocidade de relaxamento voltou ao valor inicial registrado na concentração fisiológica de 2 mM (Fig.25).

Para verificar se este aumento na força de contração causado pelo aumento da concentração de cálcio extracelular é mantido em diferentes frequências de estimulação, as tiras expostas à 10 mM de cálcio na solução foram submetidas a um aumento na frequência de estimulação até 2,0 Hz e os resultados obtidos foram comparados com os dados obtidos em solução

controle. Dessa forma, foi observado que a potenciação da força de contração só esteve presente na frequência inicial de 0,2Hz, sendo que o aumento da estimulação causou uma redução na força de contração, a qual se igualou aos valores obtidos em solução controle (Fig. 26).

Com relação aos parâmetros tempo-dependentes, observou-se que o TPT foi reduzido em cerca de 15% em relação aos valores controle e esta redução foi mantida até a frequência de 1,4 Hz (Fig. 27). O THR, por outro lado, não foi alterado pelo aumento na concentração de cálcio ou pelo aumento na frequência de estimulação, mantendo-se semelhante ao controle durante todo o experimento (Fig. 28).

A velocidade de contração aumentou cerca de 70% e manteve-se elevada até a frequência de 0,4Hz. Em frequências mais elevadas, a taxa de contração foi igualada ao controle e mantida assim até a frequência máxima testada experimentalmente (Fig. 29). A velocidade de relaxamento, por outro lado, manteve-se semelhante ao obtido em solução controle até a frequência de 0,8Hz. Em frequências maiores do que esta foi registrada uma significativa redução de aproximadamente 20% da velocidade de relaxamento, que é mantida em todas as demais frequências testadas (Fig. 30).

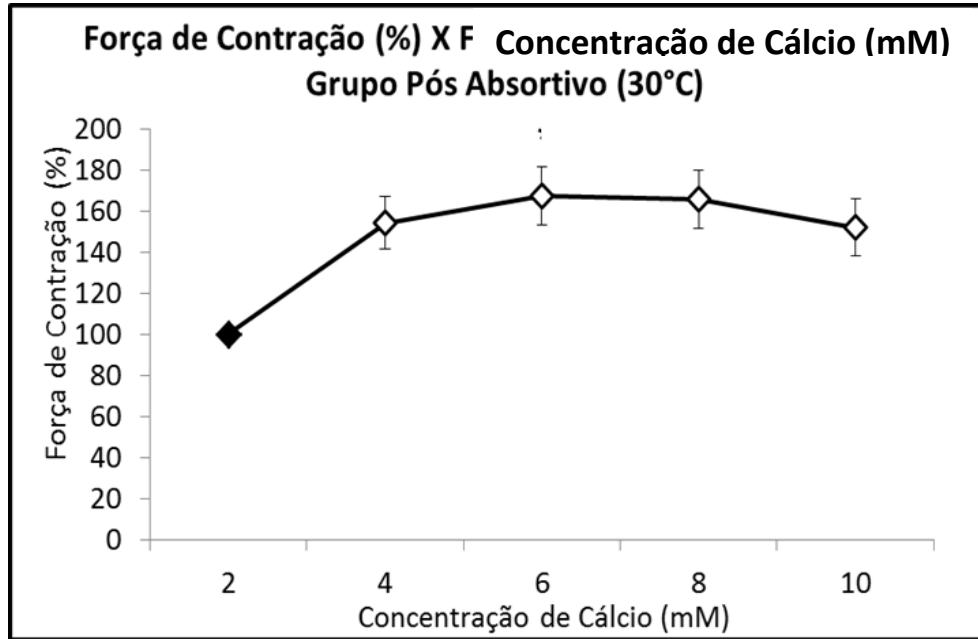


Figura 21. Alteração na força de contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio. Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$).

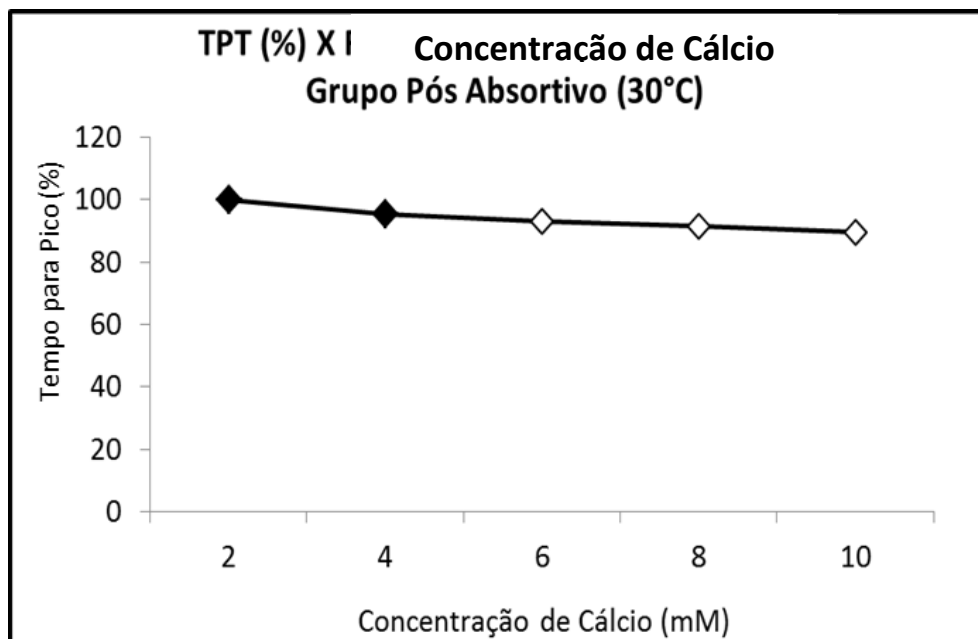


Figura 22. Alteração de TPT (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio. Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$).

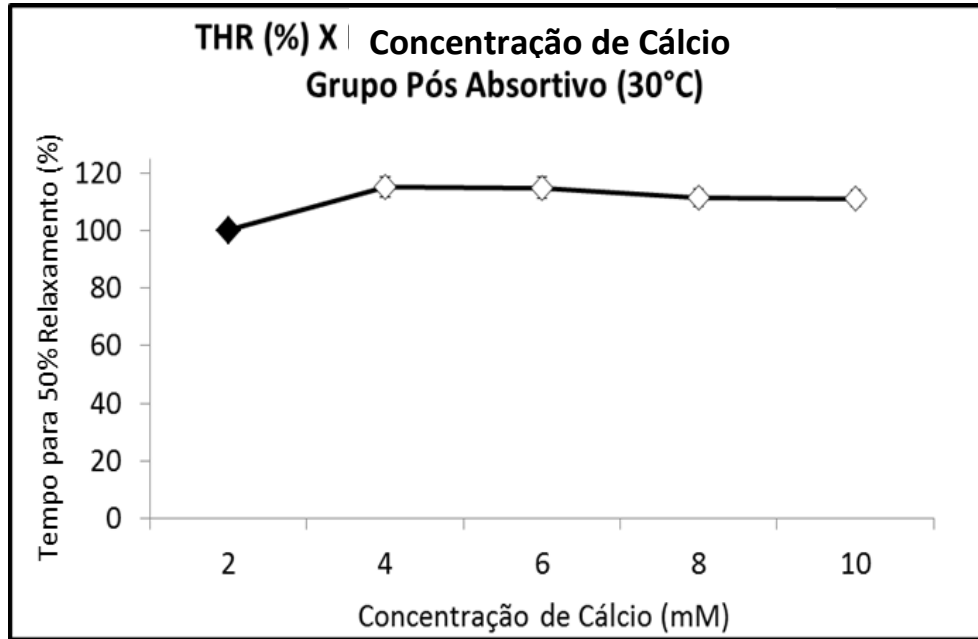


Figura 23. Alteração de THR (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio. Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$).

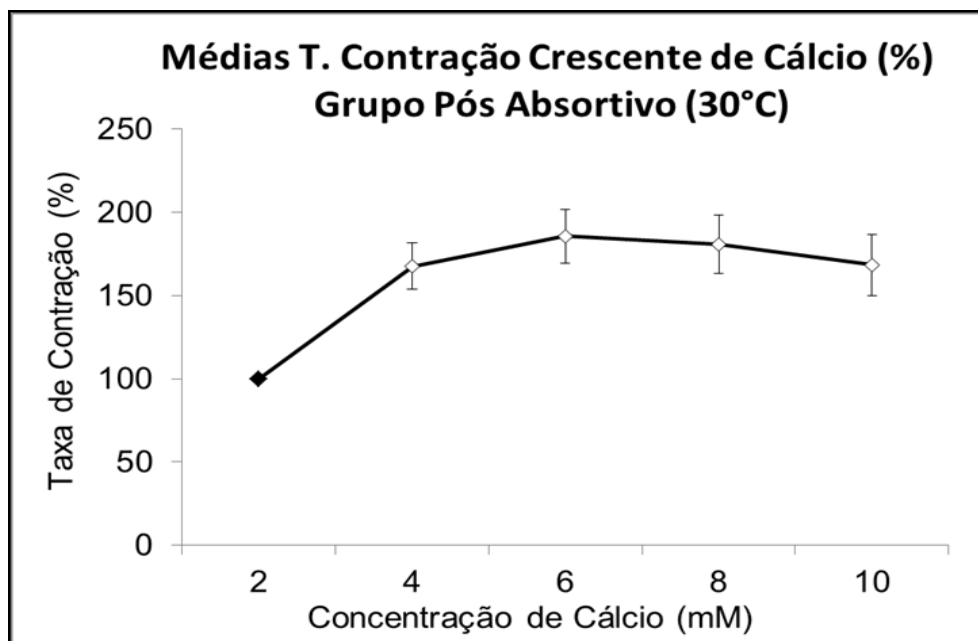


Figura 24. Alteração de Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio. Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$).

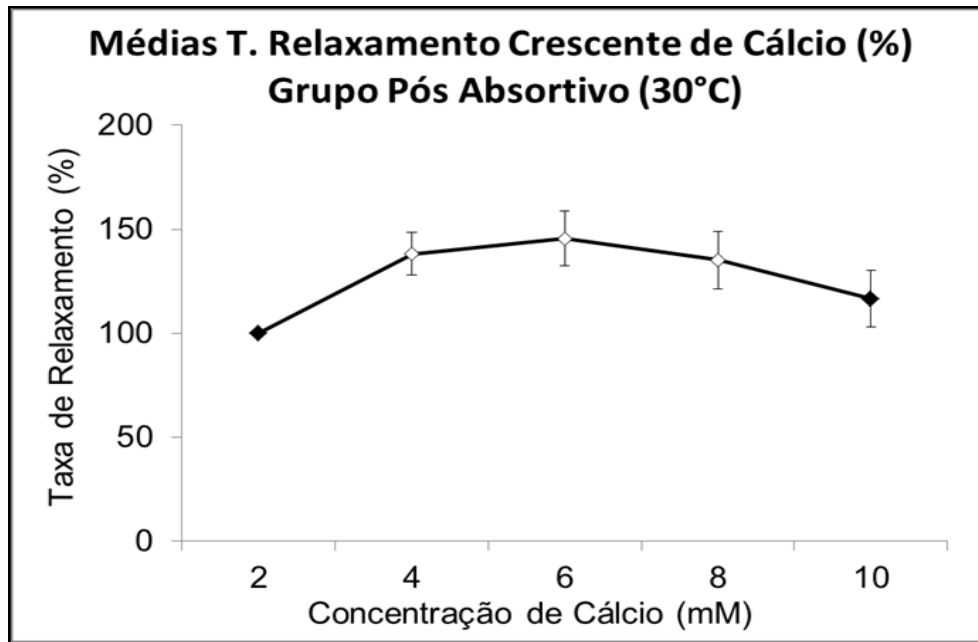


Figura 25. Alteração de Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio. Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$).

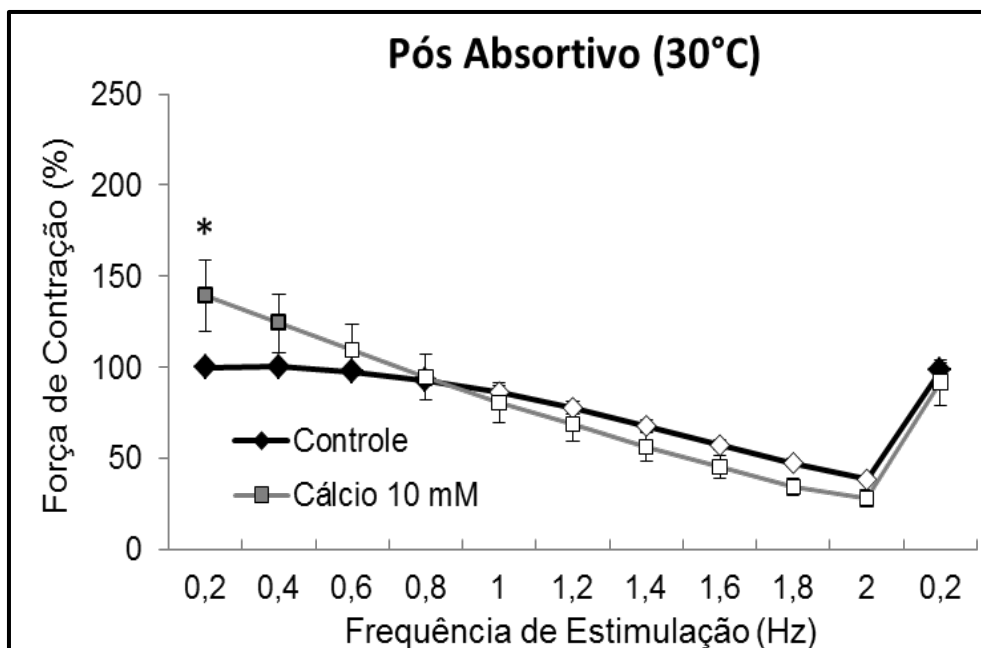


Figura 26. Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \blacklozenge) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM \square). Os valores são média \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

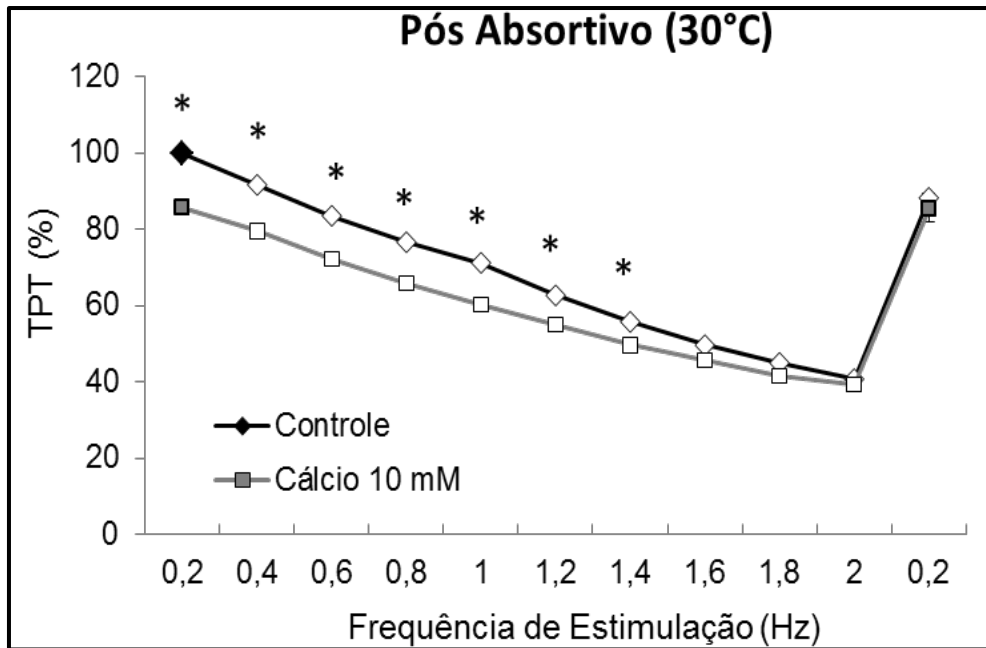


Figura 27. Alteração de TPT (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle –◆) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM –◻). Os valores são média \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

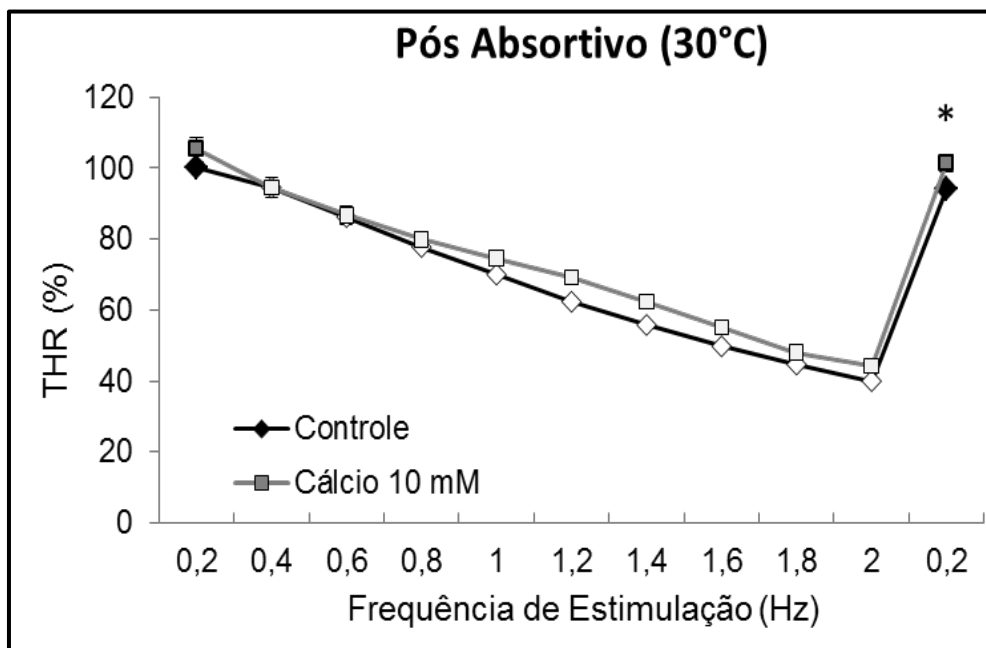


Figura 28. Alteração de THR (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle –◆) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM –◻). Os valores são média \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

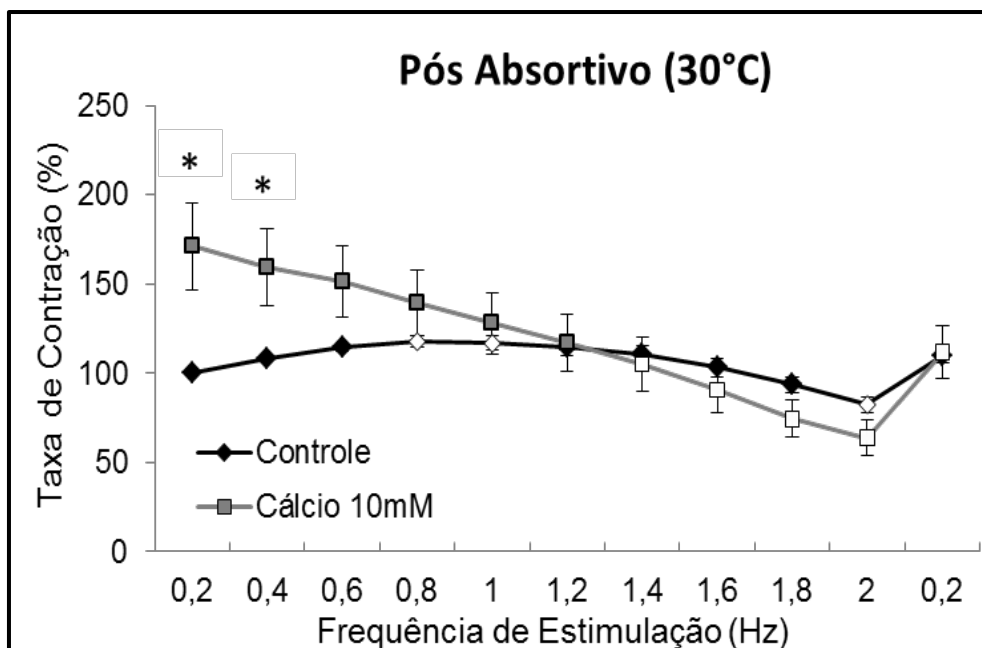


Figura 29. Alteração de Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \blacklozenge) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM \blacksquare). Os valores são média \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

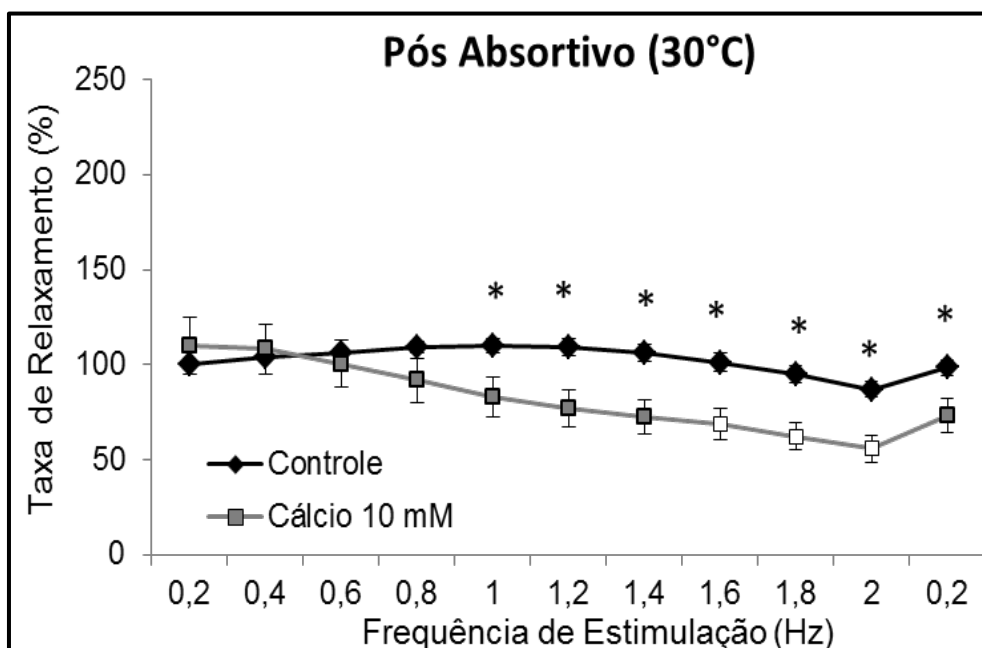


Figura 30. Alteração de Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \blacklozenge) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM \blacksquare). Os valores são média \pm EPM. Os * indicam a diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

4.6. Efeito da Adrenalina

A utilização de adrenalina visa analisar o efeito da estimulação adrenérgica sobre a função cardíaca. Para isso, foi realizado um experimento onde foram acrescentadas porções crescentes de adrenalina na solução fisiológica a qual as tiras foram submetidas.

Durante o experimento, observou-se que a função contrátil destes animais não se altera quando as tiras são expostas a concentrações de adrenalina inferiores a 10^{-3} M, uma vez que nenhum dos parâmetros analisados foi alterado em concentrações menores do que esta. Com a exposição à 10^{-3} M de adrenalina, observou-se um aumento de 70% na força de contração quando comparada ao valor inicial controle (Fig. 31). Os valores de TPT e THR também se mantiveram inalterados durante todas as concentrações testadas experimentalmente (Fig. 32 e 33). Com a alta concentração de adrenalina, a velocidade do ciclo de contração e relaxamento aumentou em comparação aos valores controle e aos obtidos nas menores concentrações deste fármaco. Foi observado um aumento de 80% na velocidade de contração das tiras ventriculares e um aumento equivalente na taxa de relaxamento (Fig. 34 e 35).

O efeito da estimulação adrenérgica em diferentes frequências de contração foi testado na concentração de adrenalina de 10^{-3} M, aumentou-se a frequência de estimulação conforme descrito nos itens anteriores. Tais resultados foram comparados aos obtidos em solução fisiológica controle. Observou-se que o aumento na força de contração causado por 10^{-3} M de adrenalina perdura até 0,8Hz. Em frequências maiores, os valores se igualam aos encontrados no controle (Fig. 36).

O aumento da frequência de estimulação associado à presença de adrenalina não causou qualquer efeito no TPT, que apresentou valores iguais aos encontrados para as preparações controle (Fig. 37). Por outro lado, a adrenalina causou uma significativa redução nos valores de THR em relação ao controle até a frequência de 1,0 Hz. A partir desta frequência, o THR se manteve constante (Fig. 38).

A exposição à adrenalina em alta concentração também levou a um aumento de 40% na velocidade de contração, que permaneceu até a

frequência de 0,6Hz (Fig. 39). A taxa de relaxamento, por outro lado, aumentou ~40% e permaneceu mais alta do que o controle por quase todas as frequências de estimulação testadas durante o experimento (Fig. 40).

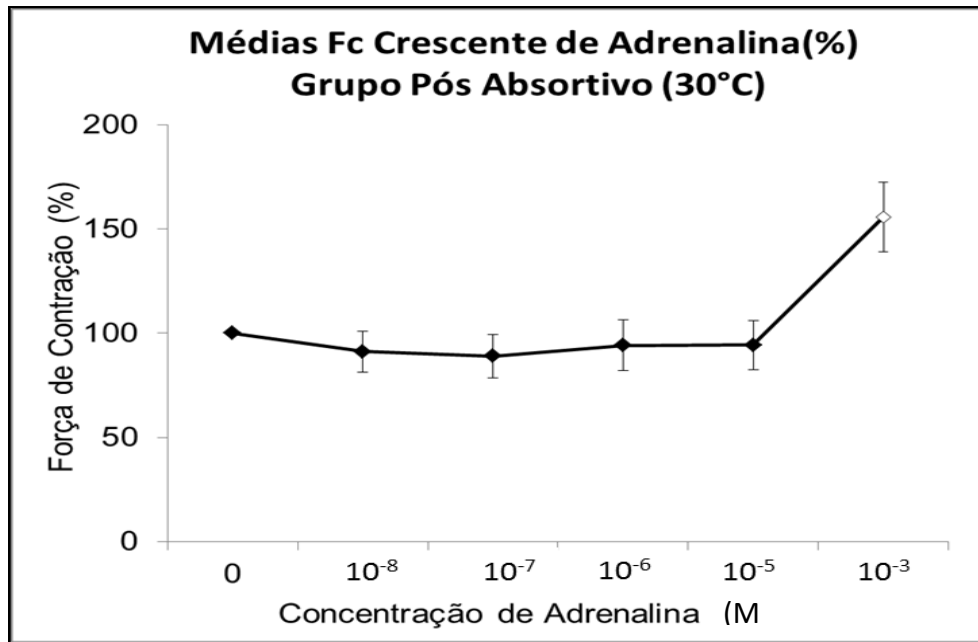


Figura 31. Alteração na força de contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina. Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$).

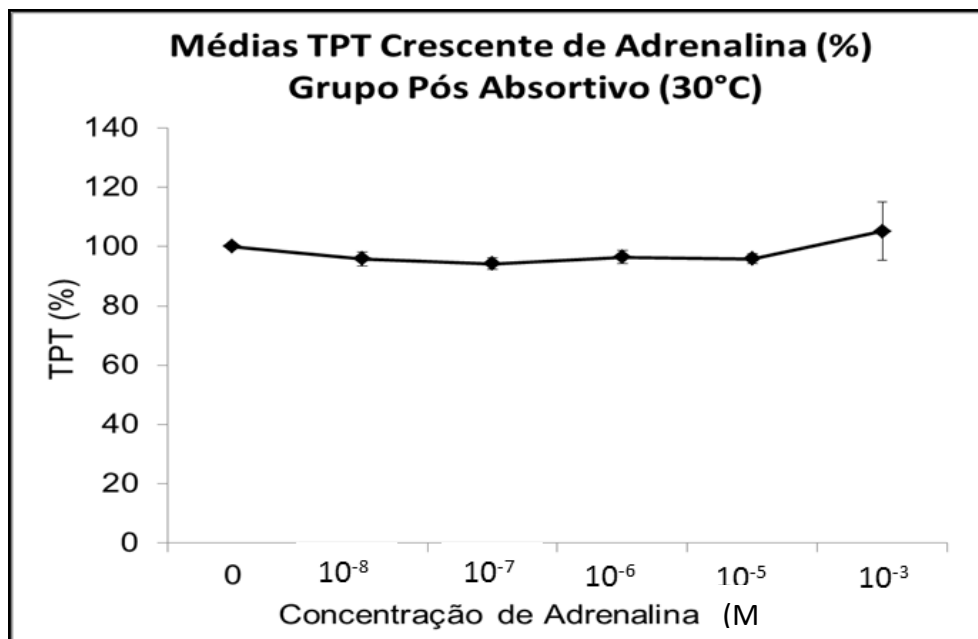


Figura 32. Alteração no TPT (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina. Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$).

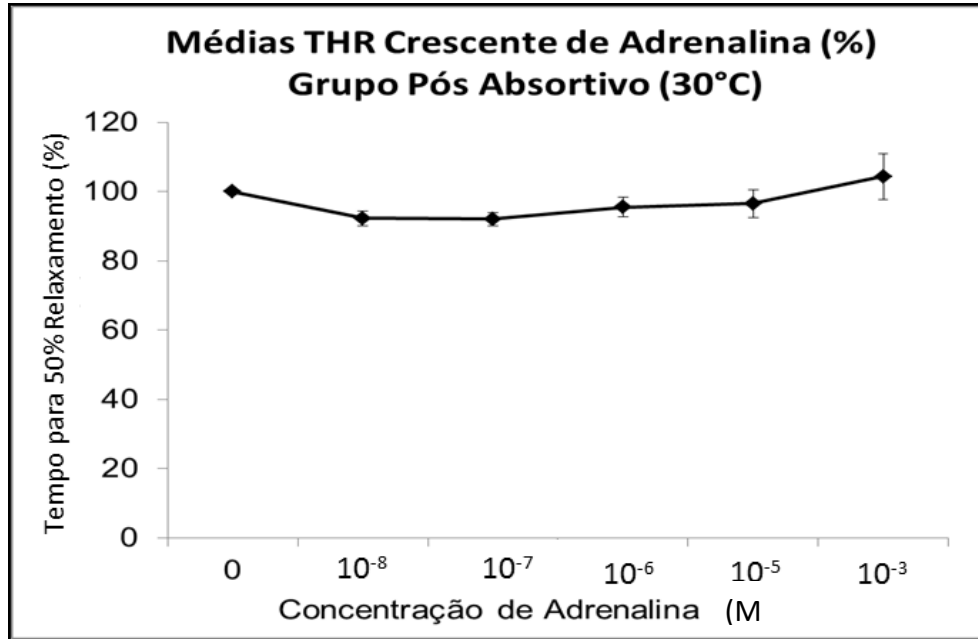


Figura 33. Alteração no THR (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina. Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$).

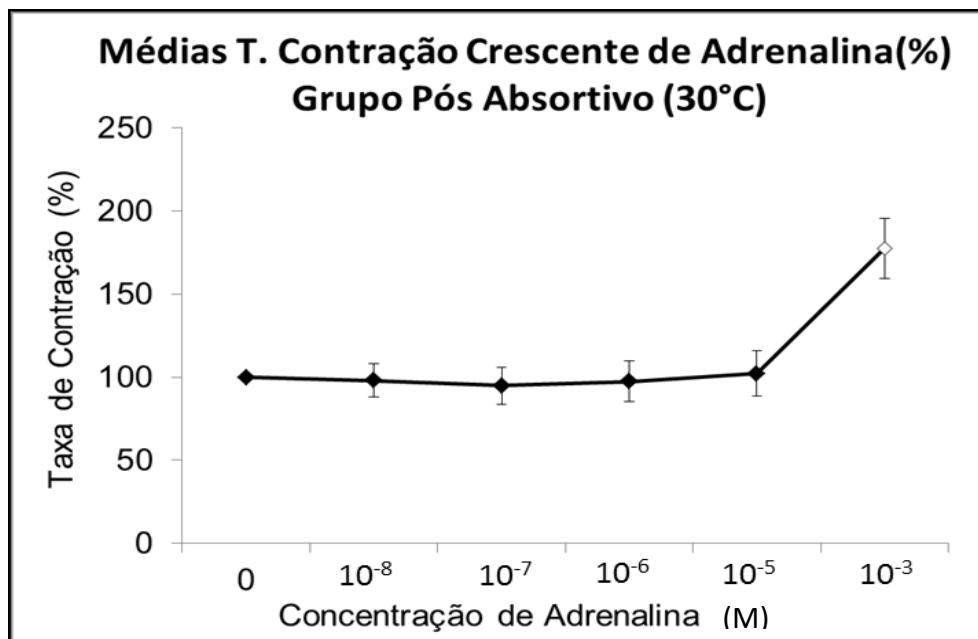


Figura 34. Alteração na Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina. Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$).

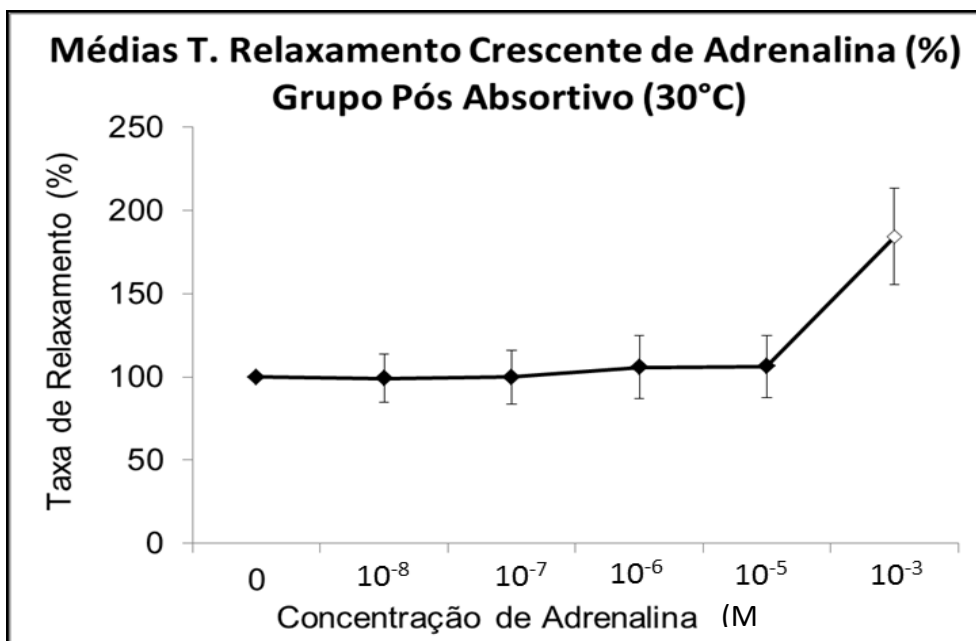


Figura 35. Alteração na Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina. Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA OneWay, Tukey, $p < 0,05$).

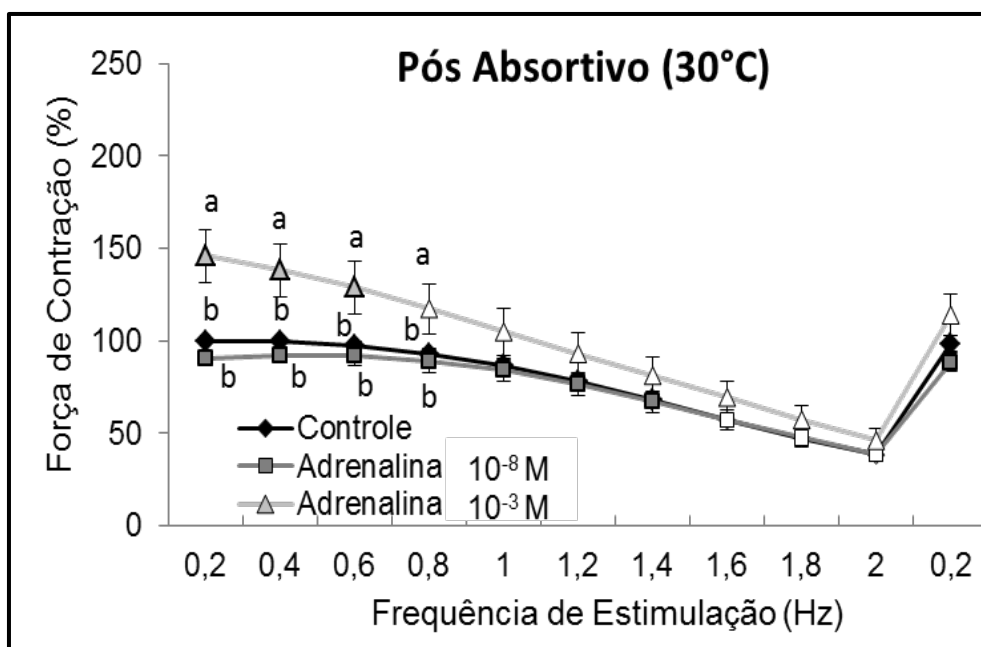


Figura 36. Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \blacklozenge), com 10⁻⁸ M de Adrenalina (Adren 10⁻⁸ M \blacksquare) e com 10⁻³ M de Adrenalina (Adren 10⁻³ M \blacktriangle). Os valores são media \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. A ausência de letras indica que não há diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

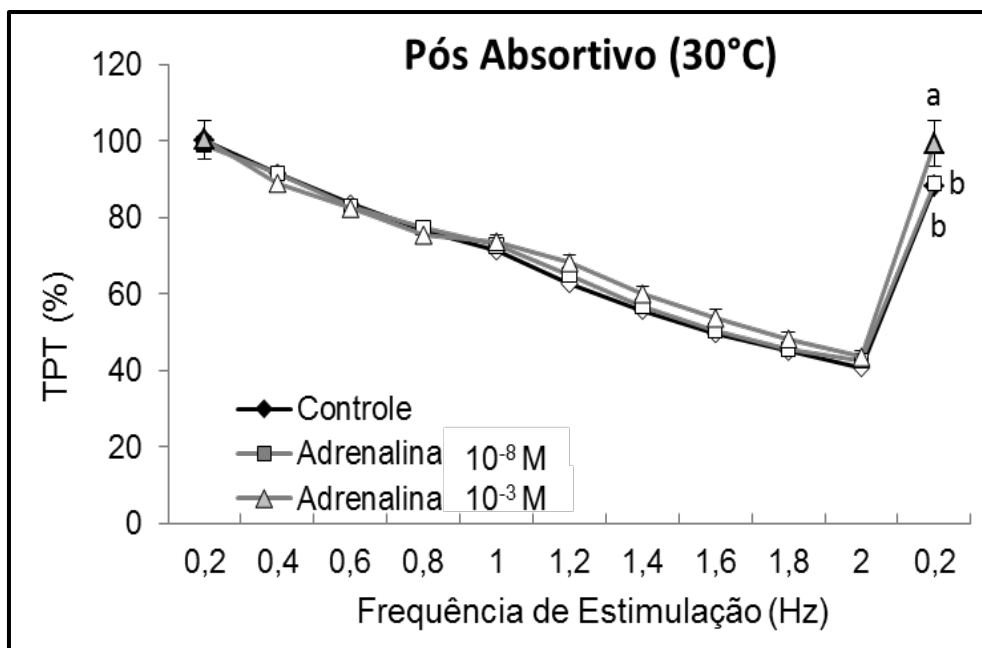


Figura 37. Alteração de TPT (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M \square) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M \triangle). Os valores são média \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. A ausência de letras indica que não há diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

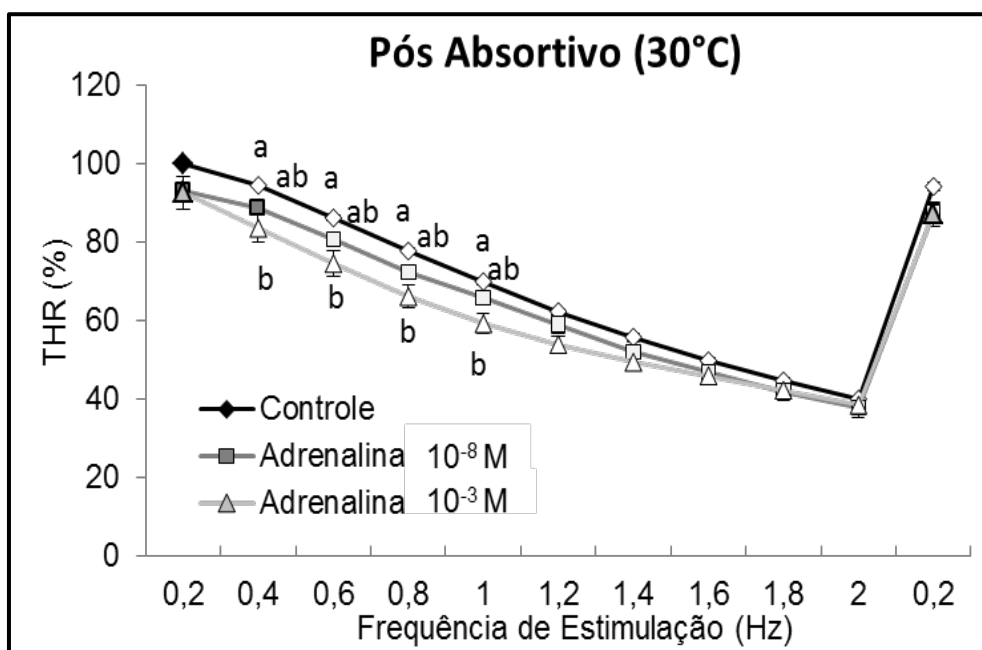


Figura 38. Alteração de THR (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle \diamond), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M \square) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M \triangle). Os valores são média \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. A ausência de letras indica que não há diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

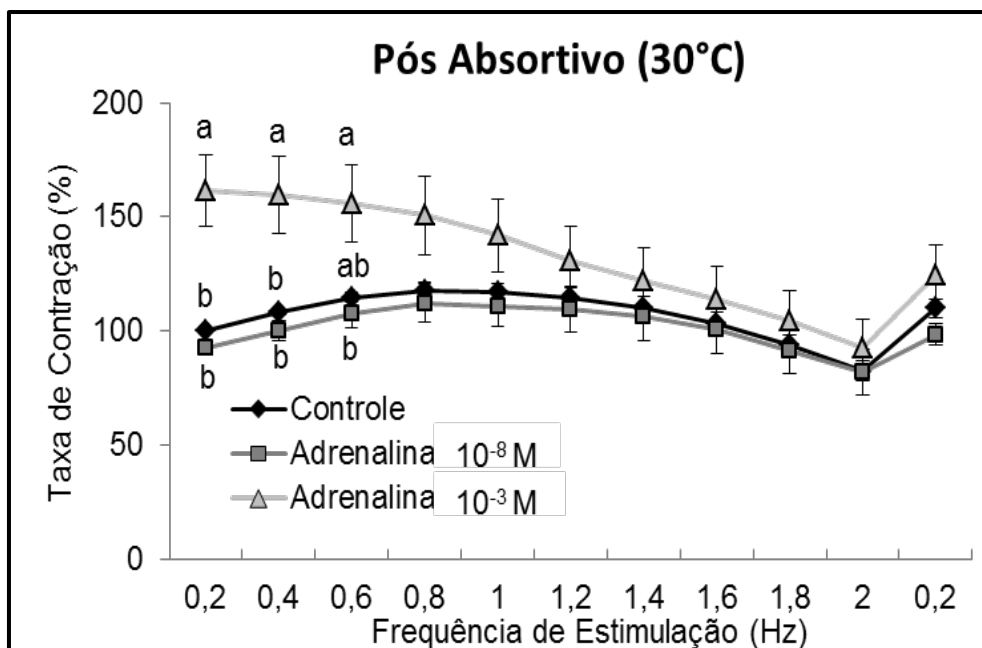


Figura 39. Alteração de Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle —●—), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M —■—) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M —▲—). Os valores são média \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. A ausência de letras indica que não há diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

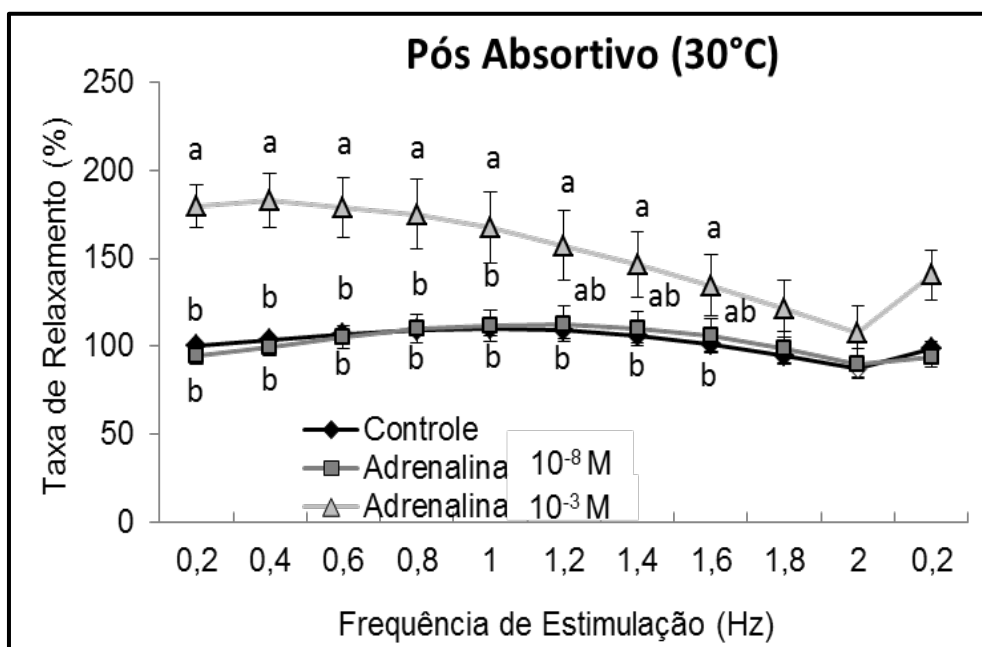


Figura 40. Alteração de Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle —●—), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M —■—) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M —▲—). Os valores são média \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos. A ausência de letras indica que não há diferença entre os grupos. Os símbolos abertos indicam diferença em relação ao valor inicial em cada grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

4.7. Tensão Pós-Pausa de 5 min

Para verificar a capacidade de estoque de cálcio no interior do RS e a importância do NCX no bombeamento de cálcio após uma pausa na estimulação, experimentos avaliando o efeito de duas substâncias, rianodina e lítio, na ciclagem de cálcio do miócito cardíaco de cascavéis foram realizados.

Em preparações controle, após a pausa de 5 minutos na estimulação, verificou-se uma redução na força de contração em relação aos valores obtidos antes da pausa (decaimento pós-pausa da Fc). A exposição ao lítio causou uma potenciação da força de contração quando comparada aos valores obtidos antes da pausa na estimulação e após a pausa em solução controle. Em solução contendo rianodina observou-se uma redução na força de contração em relação aos valores pré-pausa, no entanto semelhante àquela registrada em solução controle (Fig. 41).

Em relação aos parâmetros tempo-dependentes, foi observado que o TPT das tiras expostas à preparação controle e rianodina é maior do que o registrado nas contrações pré-pausa. Este comportamento não foi observado nas preparações contendo lítio, onde foi registrado um TPT semelhante ao registrado antes da pausa estimulatória (Fig. 42). O THR das tiras controle e rianodina após a pausa mostrou-se semelhante ao registrado pré-pausa, enquanto as tiras expostas ao lítio apresentaram um significativo aumento no tempo para metade do relaxamento quando comparado ao controle pós-pausa e aos valores pré-pausa (Fig. 43).

As taxas de contração e relaxamento também são alteradas com a pausa estimulatória de 5 minutos. Em solução controle, foi registrada uma redução de cerca de 30% na taxa de contração após a pausa de 5 minutos em relação aos valores pré-pausa. Essa resposta foi semelhante à registrada durante a exposição à rianodina, não sendo observada diferença entre o grupo controle e rianodina após a pausa diastólica. Quando expostas ao lítio, as tiras apresentaram um significativo aumento na velocidade de contração em relação aos valores controle pré e pós-pausa (Fig. 44). A taxa de relaxamento se reduz significativamente após a pausa estimulatória nas tiras em solução controle e com rianodina em relação aos valores pré-pausa, porém não são diferentes entre si. Em solução contendo lítio, a velocidade de relaxamento foi igual à

registrada antes da pausa diastólica, porem maior do que a registrada após a pausa em solução controle (Fig. 45).

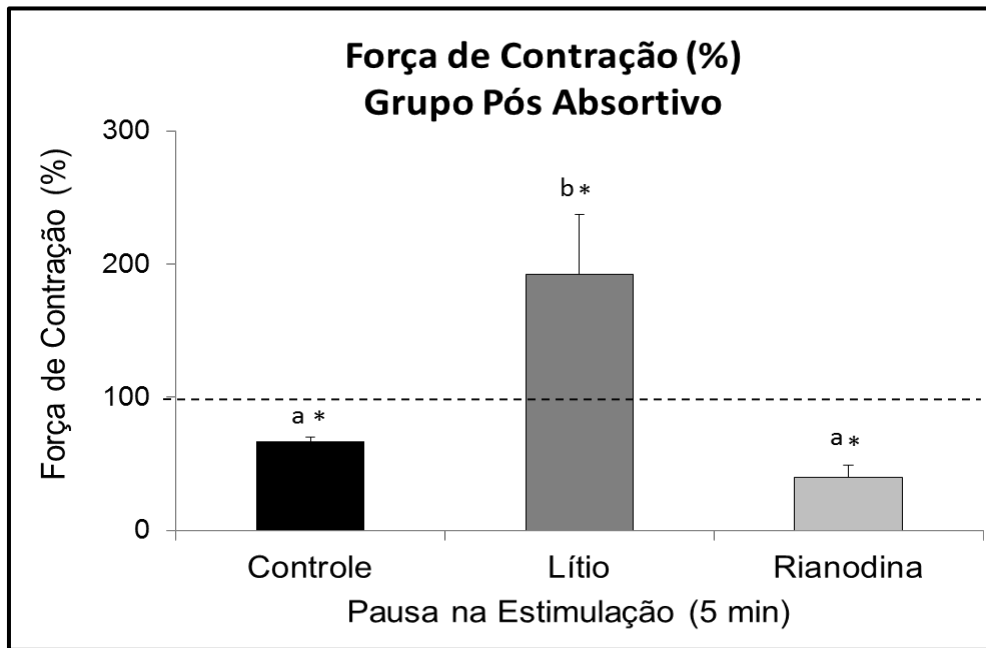


Figura 41. Força de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle (preto), rianodina (cinza claro) e lítio (cinza escuro) após pausa de 5 minutos na estimulação. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

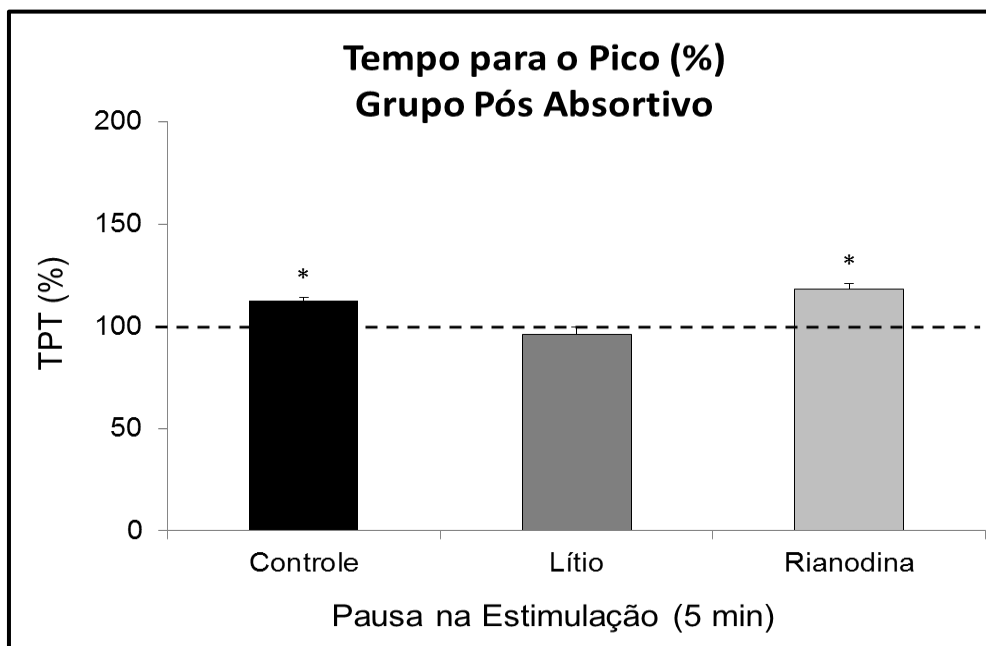


Figura 42. TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle (preto), rianodina (cinza claro) e lítio (cinza escuro) após pausa de 5 minutos na estimulação. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

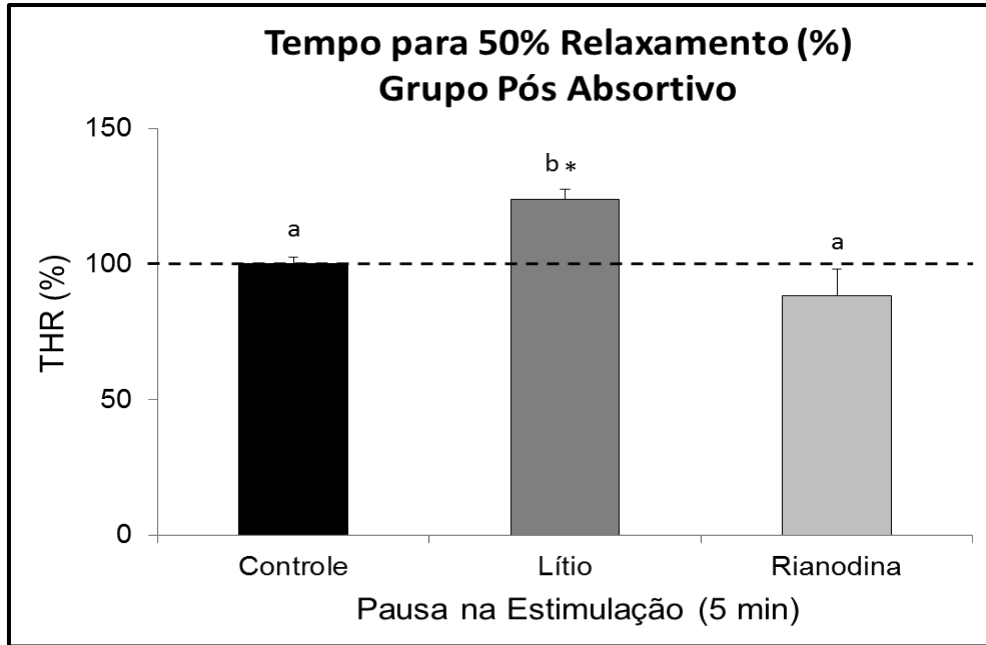


Figura 43. THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle (preto), rianodina (cinza claro) e lítio (cinza escuro) após pausa de 5 minutos na estimulação. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

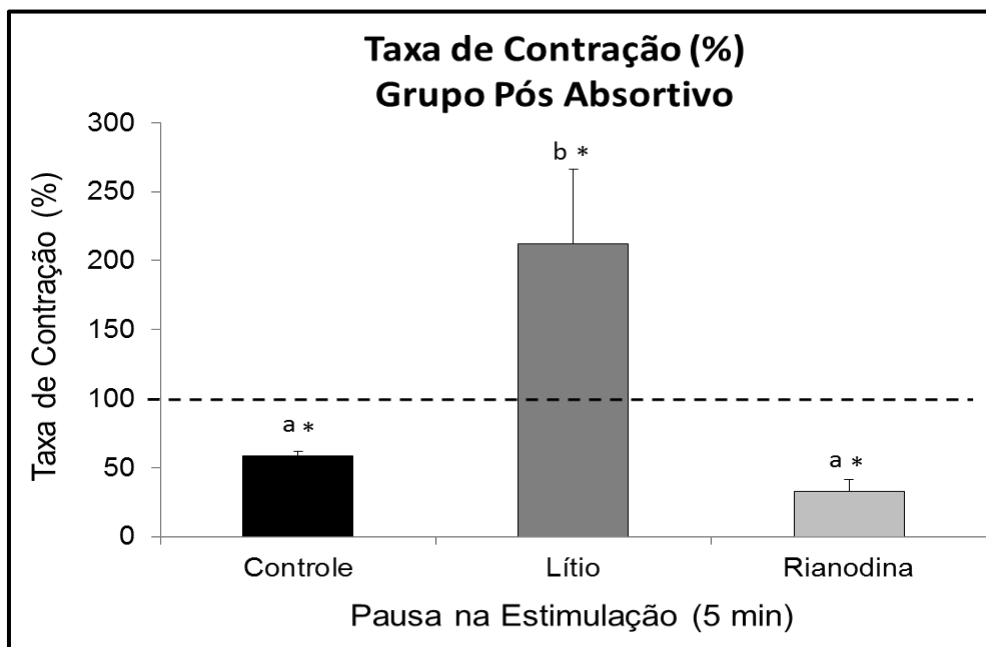


Figura 44. Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle (preto), rianodina (cinza claro) e lítio (cinza escuro) após pausa de 5 minutos na estimulação. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

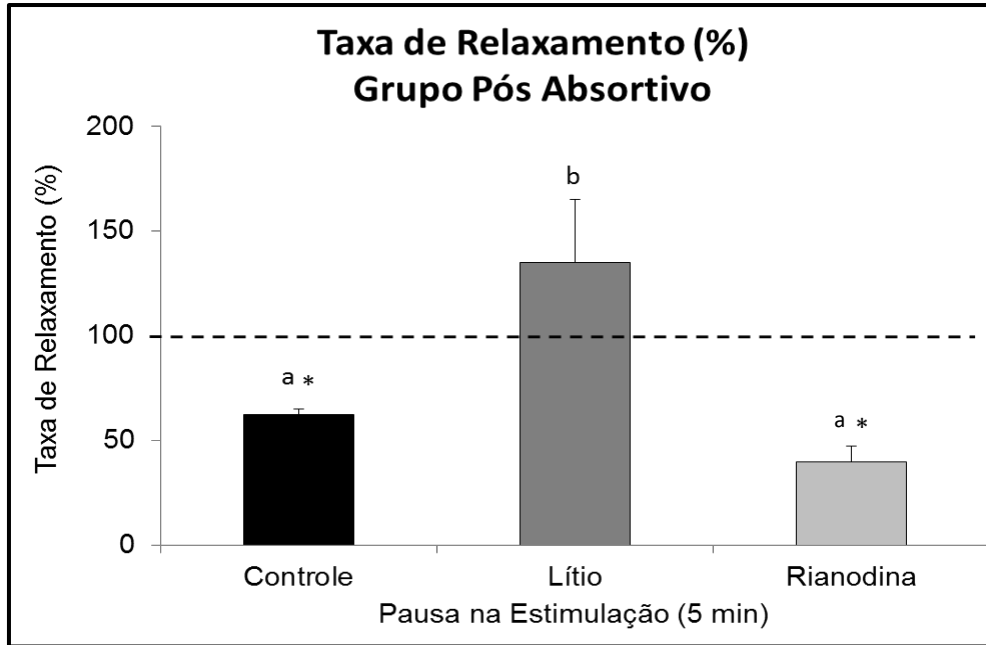


Figura 45. Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle (preto), rianodina (cinza claro) e lítio (cinza escuro) após pausa de 5 minutos na estimulação. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Comparação entre Força da Base e do Ápice Ventricular

No presente estudo, não foram observadas alterações significativas na força de contração (F_c) ou nos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) ao longo do tempo experimental de 40 minutos. Tais resultados atestam que as alterações encontradas nestes parâmetros nas condições experimentais testadas estão estritamente relacionadas à situação fisiológica ou farmacológica empregada para realização dos experimentos. Todos os demais protocolos foram realizados dentro desse período de tempo.

A grande variação dos valores de força de contração encontrada ao longo dos experimentos deu-se porque partes diferentes do ventrículo podem ter diferentes capacidades de gerar tensão. Com a divisão das tiras ventriculares em dois grupos, verificou-se uma diferença entre a força de contração gerada pelas tiras localizadas próximas ao ápice ventricular (menor F_c) e a base (maior F_c). Apesar disso, o aumento na frequência de estimulação causou o mesmo efeito escada negativo em tiras de ambas as regiões ventriculares, evidenciando o mesmo padrão de funcionamento a despeito da diferença de força gerada.

De acordo com Streeter *et al.* (1969), há uma diferença no ângulo de orientação das fibras nas diferentes partes do ventrículo de mamíferos, as quais são mais entrelaçadas na região do ápice. Esta diferença no tecido poderia ser responsável por tal variação na F_c . Durante o estiramento das tiras no experimento, supõem-se uma melhora no alinhamento das fibras miocárdicas. Isso explica o aumento na geração de força após a estabilização na tira estirada. O entrelaçamento das fibras nas tiras próximas ao ápice faria com que o estiramento não fosse tão eficiente quanto na outra parte do miocárdio, de forma que a capacidade de geração de força seria menor.

Não há registro na literatura que mostre uma situação semelhante à apresentada neste trabalho. Em função disso, não se pode afirmar que esta é uma situação comum em outras espécies. Além disso, outros trabalhos avaliando a contratilidade miocárdica de répteis também não especificam exatamente qual região do ventrículo foi utilizada e, baseado no presente

resultado, isso seria uma importante informação se os dados fossem apresentados como valores brutos (GALLI *et al.*, 2006; GALLI *et al.*, 2009; JENSEN *et al.*, 2011).

O presente conjunto de dados não é suficiente para validar tal proposta. Para tal, análises histológicas do tecido poderiam confirmar se as fibras próximas ao ápice ventricular são mais entrelaçadas do que na base nestes animais. Outra possível abordagem seria a utilização do miócito isolado de ambas as regiões do ventrículo. Assim, seria possível medir com maior precisão se de fato células do ápice e base ventricular tem a mesma capacidade de gerar força, ou se a diferença apresentada neste trabalho se dá em função da disposição das fibras no tecido.

De qualquer forma, estes dados levantam uma questão pouco explorada até o momento. Pelo que foi apresentado, passa a ser de grande importância que as tiras utilizadas durante os experimentos sejam retiradas sempre da mesma região do ventrículo em todos os animais testados ou, caso o ventrículo todo seja utilizado, que as tiras sejam separadas em dois grupos para melhor análise dos resultados nos diferentes protocolos testados. Essa informação é importante tanto para a análise da contratilidade miocárdica de uma espécie quanto para a comparação da força de contração, velocidade e tempo do ciclo de contração entre diferentes espécies.

5.2. Efeito do Bloqueio do Retículo Sarcoplasmático

O decréscimo na força de contração acarretado pelo aumento na frequência estimulatória pode estar ligado à redução da concentração de cálcio presente no citosol do miócito cardíaco. O decréscimo na concentração de cálcio citosólico pode ocorrer devido a um reduzido influxo via canais do tipo-L, por uma diminuição na concentração de Na^+ no citosol, que prejudicaria a troca por cálcio via NCX, ou ainda por uma redução no estoque/liberação de cálcio no interior do RS (SHIELS, 2002).

A comparação entre os dados obtidos em solução fisiológica controle e após a exposição à rianodina mostrou uma redução significativa de 40% na geração de tensão que se mantém em todas as frequências testadas experimentalmente. Esse é um indício de que o retículo sarcoplasmático é

funcional e é um importante fornecedor de cálcio para a contração muscular, à despeito da frequência de contração. Apesar disso, pelos métodos utilizados, não há como afirmar qual o nível de participação do RS no fornecimento de cálcio, pois a rianodina, ao bloquear o RS, aumenta o influxo de cálcio através da sarcolema (SHATTOCK & BERS, 1987).

Em outras espécies de répteis, não foi registrada uma participação expressiva do RS na contração dos miócitos cardíacos, visto que o efeito da rianodina só foi significativo quando testado em píton birmanesa (*Python molurus*) ou em lagarto varanídeo (*Varanus exanthematicus*), sendo observada uma redução de 10-20% na força de contração em frequências cardíacas registradas em animais *in vivo* (GALLI *et al.*, 2006). Os autores do trabalho sugerem que nestas espécies, o metabolismo, a frequência cardíaca e a pressão sanguínea sistêmica são maiores do que os encontrados em outras espécies de répteis não crocodilianos e que isso exigiria uma maior contribuição do RS pra o fornecimento de cálcio.

A hipótese de que a funcionalidade do RS estaria ligada ao metabolismo acelerado também é bastante discutida em peixes. No entanto, algumas espécies de baixa atividade como traíras (*Hoplias malabaricus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e matrinxã (*Brycon cephalus*) apresentam significativa participação do RS no fornecimento de cálcio para a contração ventricular (ANELLI *et al.*, 2004; RIVAROLI *et al.*, 2006; OLLE, 2007), enquanto outras espécies mais ativas como o amborê de poças-de-maré (*Bathygobius soporator*) e a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) são totalmente dependentes do cálcio extracelular para a contração, sendo que o RS não se mostrou funcional (RANTIN *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2000). Em função disso, alguns pesquisadores sugerem que a funcionalidade do RS e a sua participação no fornecimento de cálcio para a contração do miócito pode estar ligada à filogenia da espécie e não ao hábito (RIVAROLI *et al.*, 2006).

O efeito da rianodina também foi avaliado após uma pausa diastólica prolongada e não-fisiológica, para observar o efeito do bloqueio do RS sobre a contração após um intervalo na estimulação. Foi registrado, mesmo em solução fisiológica controle, uma queda significativa na força de contração após a pausa de 5 minutos na estimulação. Após a exposição à rianodina, foi observada apenas uma tendência à redução em relação ao controle pós-

pausa, porém não foi encontrada diferença significativa. Esse mesmo resultado também foi encontrado para o miocárdio ventricular pítons e lagartos varanídeos (GALLI *et al.*, 2006). Em mamíferos, foi sugerido que durante a pausa estimulatória há um vazamento de cálcio do RS que passa a ser bombeado para o meio extracelular via NCX (BERS, 2001).

5.3. Efeito do Bloqueio do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Os resultados obtidos levantaram a hipótese de que o NCX não é apenas o principal responsável pela retirada de cálcio do citosol, como também funciona mais rápido do que a SERCA. Essa possibilidade foi enfatizada com o teste de exposição das tiras ao lítio, causando o bloqueio do NCX. Após a pausa estimulatória, foi registrado um significativo aumento na força de contração em relação aos valores pré e pós-pausa em solução fisiológica controle.

O teste de aumento na frequência de estimulação em solução de lítio causou redução na força de contração de cerca de 20%, mostrando que o NCX não funciona apenas na extrusão de cálcio para o meio extracelular, como também trabalha fornecendo cálcio para a contração do miócito. Em altas frequências de estimulação (acima de 0,8 Hz) as tiras perdem a capacidade de contração provavelmente pela deficiência na capacidade de ciclagem de cálcio. O aumento na concentração de cálcio livre no citosol causa dificuldade para que a célula atinja o relaxamento antes do próximo estímulo para a contração. Isso causaria a irregularidade registrada após 0,8 Hz, visto que a velocidade de relaxamento cai consideravelmente com o bloqueio do NCX.

5.4. Dependência do Cálcio Extracelular

A necessidade do cálcio extracelular para a contração do miócito também foi testada por meio da adição de quantidades crescentes de cálcio à solução. Foram observados aumentos graduais na força de contração até a concentração de 6 mM de cálcio. O aumento na concentração de cálcio extracelular também resultou em aumento na velocidade de contração e relaxamento das tiras ventriculares. Este aumento de até 70% na força de contração indica que o cálcio extracelular é o principal ativador da contração do

miócito ventricular de cascavel, apesar do RS desempenhar importante papel no fornecimento de cálcio e que a função cardíaca pode ser alterada se a concentração de cálcio circulante disponível para a contração for aumentada.

Em altas concentrações de cálcio, o aumento na força de contração está presente apenas na frequência inicial de 0,2 Hz. Em frequências maiores do que esta, a força de contração se iguala a do controle. A velocidade de contração, entretanto, é maior do que a do controle até a frequência de 0,4 Hz. A velocidade de relaxamento é menor do que a do controle em altas frequências de estimulação (a partir de 1,0 Hz). Isso demonstra que dentro da faixa de frequências fisiológicas (aproximadamente entre 0,4 e 1,0 Hz; CLÉO LEITE, *dados não publicados*) o aumento na disponibilidade de cálcio extracelular não oferece uma vantagem contrátil ao animal.

5.5. Efeito da Estimulação Adrenérgica

A concentração inicial de 10^{-8} M de adrenalina foi definida por consulta na literatura, onde trabalhos investigando estimulação adrenérgica em répteis mostraram ser uma concentração apropriada para este tipo de análise (GALLI *et al.*, 2006). Como a força de contração não foi alterada nesta concentração inicial, as tiras foram submetidas ao contínuo aumento na concentração de adrenalina até que fosse observada alteração nos parâmetros pelo estímulo adrenérgico. Notou-se que apenas em concentração de 10^{-3} M da droga é que há um significativo aumento na força de contração ventricular. Esse aumento na força de contração é observado em outros estudos envolvendo répteis e pode ser atribuído ao aumento na concentração de cálcio presente no citosol (MEESTER *et al.*, 1965; KIRBY & BURNSTOCK, 1969; VAN HARN *et al.*, 1973; PAZ DE LA VEGA, 1983; OJEWOLE & AKINWANDE, 1984; CHIU & SHAM, 1985). Sabe-se que a adrenalina tem a capacidade de fosforilar os canais de cálcio tipo L presentes na sarcolema, mantendo-os mais tempo abertos e aumentando o influxo de cálcio através da membrana (REULTER & SHOLZ, 1977; REUTER, 1983). O aumento na frequência de estimulação nestas condições mostrou que este aumento na força de contração se mantém por um largo espectro de frequências de estimulação

(0,2 - 0,8 Hz), sendo que em frequências mais elevadas os valores de F_c não diferem dos obtidos em solução controle.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados anteriormente, pode-se concluir que:

- 1- Durante o tempo experimental de 40 minutos não ocorre deterioração na força de contração das tiras ventriculares.
- 2- Há uma diferença significativa na geração de tensão de tiras próximas à base ventricular em relação às tiras do ápice, sendo a primeira, cerca de 3 vezes maior do que a encontrada na segunda.
- 3- Há diferença no tempo de contração e relaxamento mostrando que tiras próximas ao ápice demoram mais tempo para atingir o pico de contração e se relaxam mais devagar.
- 4- O aumento na frequência de estimulação causa um decréscimo na força de contração em função da redução na concentração de cálcio no citosol por: diminuição do influxo via canais do tipo-L da sarcolema, redução da troca de cálcio via NCX pela diminuição da concentração de Na^+ citosólico, ou pela redução de estoque e/ou liberação de cálcio no RS.
- 5- O RS é funcional e fornece uma porcentagem significativa de Ca^{2+} para a contração do miócito cardíaco.
- 6- A adrenalina aumenta a Fc em função do aumento da permeabilidade aos íons Ca^{2+} .
- 7- O NCX contribui não só para a retirada de cálcio livre no citosol, como também para o influxo de cálcio para o citosol durante o potencial de ação, visto que há uma redução na Fc quando este encontra-se bloqueado.
- 8- O NCX bombeia cálcio para fora do citosol de forma mais eficaz do que a SERCA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANELLI Jr., L.C.; OLLE, C.D.; COSTA, M.J.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. **Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from the neotropical teleost *Piaractus mesopotamicus*** (Holmberg 1887—Teleostei, Serrasalminidae). *Journal of Thermal Biology*, 29: 103-113, 2004.
- BAILEY, J.R., DRIEDZIC, W.R. **Decreased total ventricular and mitochondrial protein synthesis during extended anoxia in turtle heart.** *Am. J. Physiol.*, 271(40): R1660-R1667, 1996.
- BAILEY, J.R., DRIEDZIC, W.R. **Protein synthesis under conditions of anoxia and changing workload in ventricles from turtle heart.** *J. Exp. Zool.*, 278: 273-282, 1997.
- BERS, D.M. **Ca²⁺ influx and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in cardiac muscle activation during post-rest recovery.** *Am. J. Physiol.*, 248: H366-H381, 1985.
- BERS, D.M. **Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. 258p
- BERS, D.M. **Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction.** *Circulation Research*, 87:275-281. 2000.
- BERS, D. M. **Excitation-contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.** 2ª Edição. London: Kluwer, Academic Publishers. 2001.
- BERS, D.M. **Cardiac Excitation-contraction Coupling.** *Nature*, Vol 415, pp195-205. 2002.
- BERS, D.M. **Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes.** *Annu. Rev. Physiol*, 70: 23 - 49. 2008.
- BOSSSEN, E.H., SOMMER, J.R. **Comparative stereology of the lizard and frog myocardium.** *Tiss. Cell.*, 16: 173-178, 1984.
- CHAPMAN, R.A. **Control of cardiac contractility at the cellular level.** *Am. J. Physiol.*, 245 (14): H535-H552, 1983.
- CHIU, K. W. & SHAM, S. K. **Adrenergic receptors of isolated snake atria.** *Comp. Biochem. Physiol.* 81C: 445-450. 1985.

- COSTA, M.J.; RIVAROLI, L.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. **Cardiac tissue function of the teleost fish *Oreochromis niloticus* under different thermal conditions.** Journal of Thermal Biology, 29: 81-89. 2000.
- DI MAIO, A.; BLOCK, B. A. **Ultrastructure of the sarcoplasmic reticulum in cardiac myocytes from Pacific bluefin tuna.** Cell Tissue Res, 334: 121-134. 2008.
- DRIEDZIC, W.R.. **Cardiac energy metabolism.** Em *Fish Physiology*, vol. 12, pt A. Ed. W. S. Hoar, D.J. Randall e A.P. Farrell. New York: Academic Press. pp219-266. 1992.
- DRIEDZIC, W.R.; GESSER, H. **Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature.** Physiol. Rev., 74(1): 221-258, 1994.
- FABIATO, A. **Calcium release in skinned cardiac cells: Variation with species tissues and development.** Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. Exp. Biol., 41: 2238-2244, 1982.
- FABIATO, A. **Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum.** Am. J. Physiol., 245(14): C1-C14, 1983.
- FARRELL, A.P.; FRANKLIN, C.; ARTHUR, P.; THORARENSEN, H., COUSINS, K. **Mechanical performance of an in situ perfused heart from the turtle *Chrysemys scripta* during normoxia and anoxia at 5°C and 15°C.** J. Exp. Zool., 191(1): 207-229, 1994.
- FORBES, M.S.; SPERELAKIS, N. **Spheroidal bodies in the junctional sarcoplasmic reticulum of lizard myocardial cells.** J. Cell Biol., 60: 602-615, 1974.
- GALLI, G.L.J., GESSER, H., TAYLOR, E.W., SHIELS, H.A., WANG, T. **The role of the sarcoplasmic reticulum in the generation of high heart rates and blood pressures in reptiles.** J. Exp. Biol., 209: 1956-1963, 2006.
- GESSER, H.; POUPA, O. **Acidosis and cardiac muscle contractility: comparative aspects.** Comp. Biochem. Physiol., 76(3): A559-A566, 1983.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 10ª Edição. Editora Guanabara Koogan S.A. 2002.

- HICKMAN-JR, C.P.; ROBERTS, L.S., LARSON, A. **Integrated principles of zoology**. McGraw Hill, 11th ed., 899p, 2001.
- HICKS, J.M.T.; FARREL, A.P. **The cardiovascular responses of the red-eared slider (*Trachemis scripta*) acclimated to either 22 or 5 °C. II. Effects of anoxia on adrenergic and cholinergic control**. J. Exp. Biol., 203: 3775-3784. 2000.
- KALININ, A.L., GESSER, H. **Oxygen consumption and force development in turtle and trout cardiac muscle during acidosis and high extracellular potassium**. J. Comp. Physiol. B, 172: 145-151, 2002.
- KIRBY, S.; BURNSTOCK, G. **Pharmacological studies of the cardiovascular system in the anaesthetized sleepy lizard (*Tiliqua rugosa*) and toad (*Bufo marinus*)**. Comp. Biochem. Physiol., 28: 321-331. 1969.
- LEAK, L.V., **The ultrastructure of myofibers in a reptilian heart: the *Boa constrictor***. Am. J. Anat., 120: 553-582, 1967
- LEESON, T.S. **The Fine Structure of Snake Myocardium**. Acta Anat., 109: 252-269. 1981.
- MEESTER, W. D.; HARDMAN, H. F.; BARBORIAK, J. J. **Evaluation of various adrenergic blocking agents in isolated rabbit and turtle hearts**. Journal of Pharmacol Exp Ther., 150: 34-40. 1965.
- NIELSEN, J.S., GESSER, H. **Effects of high intracellular [K⁺] and adrenaline on force development, relaxation and membrane potential in cardiac muscle from freshwater turtle and rainbow trout**. Exp. Biol., 204(2): 261-268, 2001.
- OJEWOLE, J. A. & AKINWANDE, K. I. **Effects of sympathomimetic drugs on reptilian atrial muscles**. Methods Find Exp. Clin. Pharmacol. 5, 245-253. 1984.
- OKITA, S. **The fine structure of the ventricular muscle cells of the soft-shelled turtle heart (*Amyda*), with special reference to the sarcoplasmic reticulum**. J. Electron. Microsc. Chiba Cy, 20: 107-119, 1971.
- OLLE, C.D. **Efeito do inseticida organofosforado metilparation sobre a função cardio-respiratória do peixe teleósteo matrinxã, *Brycon cephalus***. 110p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa

de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2007.

- PAZ DE LA VEGA, Y.; VILLALOBOS, M.; ALONSO, S.; LEMUS, D. **Adrenergic activity of isolated lizard atria (*L. gravenhorsti*)**. IRCS Med. Sci. 11, 552-553. 1983.
- RANTIN, F.T.; GESSER, H.; KALININ, A.L.; GUERRA, C.D.R.; DE FREITAS, J.C.; DRIEDZIC, W.R. **Heart performance, Ca²⁺ regulation and energy metabolism at high temperatures in *Bathygobius soporator*, a tropical marine teleost**. Journal of Thermal Biology, 23: 31-39. 1998.
- REUTER, H & SHOLZ, H. **The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline**. The Journal of Physiology, 264: 49-62. 1977.
- REUTER, H. **Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs**. Nature 301: 569-574. 1983.
- 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)**. Comp. Biochem. Physiol. A, 145: 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**. Comp. Biochem. Physiol. 146A: 544-A550. 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 teleosts *Synbranchus marmoratus* under different thermal conditions**. Journal of Comparative Physiology, 177B: 713-721. 2007.
- SHATTOCK, M. J.; BERS, D. M. **Inotropic response to hypothermia and the temperature-dependence of ryanodine action in isolated rabbit and rat ventricular muscle: implications for excitation-contraction coupling**. Circ Res., 61: 761-771. 1987.

- SHI, H.; JACKSON, D.C. **Effects of anoxia, acidosis and temperature on the contractile properties of turtle cardiac muscle strips.** Journal of Experimental Biology, 200: 1965-1973, 1997.
- SHIELS, H.; VORNANEN, M.; FARRELL, A. **The force-frequency relationship in fish hearts – a Review.** Comparative Biochemistry and Physiology, 132A: 811-826. 2002.
- STREETER, D.D.; SPOTNIRZ, H.M.; PATEL, D.P.; ROSS, J.; SONNENBLICK, E.H. **Fiber Orientation in the Canine Left Ventricle during Diastole and Systole.** Circulation Research, 24:339-347, 1969.
- 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®).** Ecotoxicol. Environm. Saf., 72(5): 1413-1424, 2009.
- TIBBITS, G.F., PHILIPSON, K.D., KASHIHARA, H. **Characterization of myocardial Na⁺-Ca²⁺ exchange in rainbow trout.** Am. J. Physiol., 262(31): C411-C417, 1992.
- TOTA, B.; CIMINI, V.; SALVATORE, G.; ZUMMO, G. **Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranch and teleost fishes.** American Journal of Anatomy, 167: 15-32. 1983.
- TOTA, B.; GATTUSO, A. **Heart ventricle pumps in teleosts and elasmobranchs: a morphodynamic approach.** Journal of Experimental Zoology, 275:162–171. 1996.
- VAN HARN, G. L.; EMAUS, T. L.; MEESTER, W. D. **Adrenergic receptors in turtle ventricle myocardium.** European journal of pharmacology, 24 (2): 145-150. 1973.
- VORNANEN, M.; SHIELS, H. A.; FARRELL, A. P. **Plasticity of excitation–contraction coupling in fish cardiac myocytes.** Comp. Biochem. Physiol, 132A: 827-846, 2002
- YUE, D.T. **Intracellular [Ca²⁺] related to rate of force development in twitch contraction of heart.** Am. J. Physiol., 252: 760-770, 1987.

CAPÍTULO 2

**AJUSTES DA FUNÇÃO CARDÍACA DE CASCAVÉIS,
Crotalus durissus terrificus, DIANTE DE EXTREMOS
METABÓLICOS COMO JEJUM PROLONGADO E DIGESTÃO**

8. INTRODUÇÃO

O coração é reconhecido pela sua notável capacidade de se remodelar em resposta a demandas funcionais alteradas. O treinamento físico crônico em mamíferos, por exemplo, pode resultar em hipertrofia ventricular, o que seria benéfico por aumentar a capacidade contrátil e evitando a sobrecarga do miocárdio (COOPER, 1987). Em uma situação oposta, quando o organismo encontra-se debilitado por uma situação adversa como o jejum prolongado, é observada uma redução da massa do coração, principalmente do ventrículo esquerdo em alguns mamíferos. Algumas dessas disfunções são transitórias, podendo desaparecer após realimentação. Outras, porém, podem ser permanentes, dependendo da duração do período de privação alimentar e do estado nutricional (manutenção de proteínas e minerais) do organismo (FISLER, 1992).

Para melhor entendimento, as alterações decorrentes da digestão e do jejum prolongado em serpentes serão abordadas em tópicos separados.

8.1. Ação Dinâmica Específica

Segundo Porter e Gates (1969), “Todos os processos da vida, todos os eventos fisiológicos, realizam trabalho e consomem energia. Um fornecimento contínuo de energia é necessário para um animal sobreviver”. Dessa forma, a alimentação, é um processo imprescindível pra todos os organismos heterótrofos por prover energia para manutenção dos processos metabólicos. As formas de forrageamento, captura, ingestão e digestão das presas são fundamentais para todas as espécies e o custo efetivo destes processos interfere no “fitness” e exerceram influência nos processo evolutivos.

Dessa forma, os processos relacionados à obtenção e processamento de alimentos exercem efeitos sobre o comportamento (HUEY, 1982; DORCAS *et al.*, 1997; BLOUIN-DEMERS & WEATHERHEAD, 2001), fisiologia, e servem de gatilho para várias alterações morfológicas (PIERSMA & LINDSTRÖM, 1997; STARCK, 1999a,b; KONARZEWSKI & STARCK, 2000; STARCK & BEESE, 2001). Dentre as alterações fisiológicas decorrentes dos processos de digestão, assimilação e biossíntese, encontra-se o incremento

metabólico pós-prandial (BRODY, 1945; KLEIBER, 1975; JOBLING, 1981), também chamado de ação dinâmica específica (SDA – specific dynamic action). Esta resposta pós-prandial pode elevar consideravelmente o metabolismo geral de um indivíduo a valores extremos, muitas vezes superiores aos observados em atividade (HICKS & BENNETT, 2004). O pico metabólico da SDA pode, de forma geral, elevar a taxa metabólica em até 50% em humanos, 320% na maioria dos demais animais e de até 1600% nas serpentes com forrageamento do tipo “senta e espera” (BRODY, 1945; JOBLING, 1981; HAILEY & DAVIES, 1987; WESTERTERP-PLANTENGA *et al.*, 1992; KALARANI & DAVIES 1994; JANES & CHAPPELL, 1995; SECOR & DIAMOND, 1995).

Alguns répteis Squamatas possuem a capacidade de ingestão de grandes presas. Esta característica é notável em alguns grupos de serpentes que podem ingerir até o equivalente a 100% de sua massa corpórea (SECOR & DIAMOND, 1997a). Experimentos com a píton Birmanesa, *Python molurus*, demonstraram um aumento de até 44 vezes na taxa metabólica de repouso nos animais alimentados com o equivalente a 100% de sua massa corpórea (SECOR & DIAMOND, 1997a).

A SDA também tem sua duração proporcional à massa ingerida, podendo durar por vários dias até que todo o processo de digestão e incorporação ocorra (ANDRADE *et al.* 1997). A magnitude da SDA e sua duração configuram um extremo de atividade metabólica, principalmente se considerarmos que ectotérmicos possuem uma taxa metabólica padrão relativamente baixa.

Apesar do crescente interesse na SDA em ectotérmicos, em especial nas serpentes, ainda há muitos aspectos não esclarecidos acerca dos fatores exatos que desencadeiam a SDA, que promovem sua manutenção e sua contribuição relativa para a alteração metabólica total. Investigações recentes sugerem que grande parte da SDA poderia ser causada pela reestruturação do trato intestinal no momento da digestão. Este teria que ser rapidamente reconstruído para passar de um estado de atrofia após o período de jejum a um robusto e ativo tecido capaz de executar todos os passos para a digestão química e absorção de uma grande massa alimentar (SECOR, 2001, 2003; STARCK & BEESE, 2001, 2002; STARCK *et al.* 2004). No entanto,

outros estudos mostram não haver diferença no tempo de digestão ou pico metabólico quando serpentes são realimentadas logo após o final da primeira digestão. Isso indicaria que a reestruturação do trato digestório não interferiria no aumento metabólico pós-prandial (SECOR & DIAMOND, 1995, 1998, 2000; STARCK & BEESE, 2001, 2002). Estudos envolvendo modificações na composição da dieta destes animais não resultaram em alterações no tempo ou custo global da SDA (BENEDICT, 1932; MCCUE *et al.*, 2005; GARNETT, 1988; COULSON & HERNANDEZ, 1983). Isso indicaria que o incremento metabólico pós-prandial se dê não pelo processamento do alimento ingerido, mas sim, pela incorporação dos compostos absorvidos.

Contudo, independente de suas causas, esse grande aumento na taxa metabólica ocorre de forma aeróbica e, portanto, faz com que as necessidades de captação e transporte de oxigênio também se elevem enormemente por todo o período da SDA. O suporte da magnitude de alteração metabólica observada demandaria ajustes para captação e transporte de O₂ para evitar uma sobrecarga no sistema cardiovascular devido ao grande esforço continuado.

8.2. Jejum

O jejum é um termo que se refere a uma frequente condição biológica onde um animal é impossibilitado de se alimentar, seja pela falta de alimento no ambiente em que vive ou, simplesmente, porque opta por dispendar tempo e energia realizando outra atividade, como fugir de um predador, se reproduzir, proteger a cria ou mesmo um estado de depressão metabólica ou torpor (MROSOVSKY & SHERRY, 1980; ANDERSON & KARASOV, 1988; CHEREL *et al.*, 1988; DOUCETT *et al.*, 1999; BARBOZA & JORDE, 2001; RANDALL & KING, 2001). Em humanos, a subnutrição e jejum são frequentemente encontrados em classes sociais mais baixas e, historicamente, esteve presente e foi de grande importância durante a formação da sociedade atual, principalmente em eventos de guerra, acidentes naturais ou desigualdade social (KEYS, 1950).

Apesar da importância do tema, estudos sobre esta condição ainda são raros e pouco abrangentes, sendo que a maioria das investigações acerca das respostas fisiológicas e bioquímicas à ausência de alimento é centrada em mamíferos e aves (WANG *et al.*, 2006). Uma parte da literatura concentra-se na resposta à privação alimentar em peixes criados comercialmente (PHILLIPS *et al.* 1960; INUI & OSHIMA 1966). Apesar dos esforços para investigar as respostas biológicas à fome nestes 3 grupos de vertebrados, a fisiologia do jejum é mal caracterizada em ectotérmicos terrestres.

A resposta à privação de alimento pode variar em função da estrutura corpórea, tamanho e quantidade das reservas energéticas disponíveis. Além disso, também pode haver alterações entre ordens, gêneros e espécies, ou mesmo entre graus de desenvolvimento, sexo ou característica de cada indivíduo. Entretanto, estes efeitos dependem principalmente das diferenças na estrutura e composição corpórea que alteram a demanda e suprimento metabólico (JACKSON, 1925). A literatura tradicionalmente divide o jejum em 3 fases distintas (ROBIN *et al.*, 1987; CHEREL *et al.*, 1988; CASTELLINI & REA, 1992; HERVANT & RENAULT, 2002; CALOIN, 2004) caracterizadas por alterações fisiológicas como redução na massa corpórea ou excreção de nitrogênio (ROBIN *et al.*, 1983, 1987; CHEREL *et al.*, 1988; LE MAHO *et al.*, 1988) ou níveis de carboidratos, lipídios ou proteínas (CAHILL, 1976; CASTELLINI & REA, 1992; HERVANT *et al.*, 2001; HERVANT & RENAULT, 2002; CALOIN, 2004).

Em estudo mais recentes, as fases do jejum tem sido separadas pela mudança sequencial na redução da massa corpórea dos animais submetidos a longos períodos em jejum. Com isso, o que se pode observar é uma rápida queda inicial na massa corpórea (fase 1) que se deve, provavelmente à queima do estoque de glicose com a mobilização das reservas de carboidratos; seguida por uma baixa perda de massa corpórea (fase 2), onde passa-se a consumir preferencialmente as reservas de gordura disponíveis no organismo; e por fim, o retorno à uma queda rápida nessa taxa (fase 3), indicando que as reservas lipídicas terminaram e que o animal utiliza a proteólise como principal meio de suprir a demanda metabólica. No entanto, o

tempo de cada fase é muito variado entre as espécies em função de dois fatores: a demanda energética para a manutenção de cada organismo (GARLAND *et al.*, 2005; MUNOZ-GARCIA & WILLIAMS, 2005; CRUZ-NETO & JONES, 2006) e a forma que cada espécie tem de economizar energia durante um período de privação (COULSON & HERNANDEZ, 1968; BRYDEN & STOKES, 1969; LINDSTEDT & BOYCE, 1985; NAVARRO & GUTIERREZ, 1995; MCCUE, 2007a). Em função disso, o tempo máximo em que cada espécie consegue permanecer em privação alimentar pode variar de dias a meses.

Diante de respostas às condições de jejum demonstradas por alguns animais, as serpentes estão entre os poucos animais estudados que toleram o jejum com sucesso por períodos que podem chegar a vários meses (KLAUBER, 1972; MARTIN & BAGBY 1973; BLOOD, 1993; DE VOSJOLI *et al.* 1995; WANG *et al.* 2006). Um experimento realizado por McCue (2007) buscando investigar as respostas fisiológicas e bioquímicas do jejum que ocorrem em cascavéis, *Crotalus atrox*, demonstrou que as serpentes mantidas até 168 dias em jejum exibiram uma redução significativa na glicose plasmática e um consequente aumento dos corpos cetônicos na circulação. Os animais sem alimento perderam peso de forma linear e apresentaram um aumento na quantidade de ácidos graxos circulantes. Foi observado também que há utilização de aminoácidos essenciais e não essenciais durante todo o experimento.

Diante de uma situação adversa como o jejum, alguns ectotérmicos recorrem a diferentes estratégias para reduzir a demanda metabólica até o fim da escassez alimentar. Estudos mostram que peixes, anfíbios e répteis submetidos ao jejum recorrem à termorregulação comportamental como forma de reduzir a temperatura corpórea e com isso, a taxa metabólica (LILLYWHITE *et al.*, 1973; ABE, 1995; VAN DIJK *et al.*, 2002; BROWN & GRIFFIN, 2005; BICEGO *et al.*, 2007). Um ajuste fisiológico que também é registrado é a atrofia do trato digestório. O fígado e a reserva adiposa também são atrofiados, porém mais lentamente do que a taxa de redução do intestino. Outros órgãos como cérebro, rins e gônadas não apresentam redução de massa, sugerindo que estes são poupados nos

processos catabólicos ou são catabolizados mais lentamente. A alteração de massa no coração de repteis é provável, mas um fato ainda bastante discutido. Em humanos, alguns registros demonstram haver alteração do tamanho desse órgão por análise de raio-x (Fig. 1), enquanto outros estudos indicam que a massa relativa deste órgão é preservada durante o jejum (KEYS *et al.*, 1950).

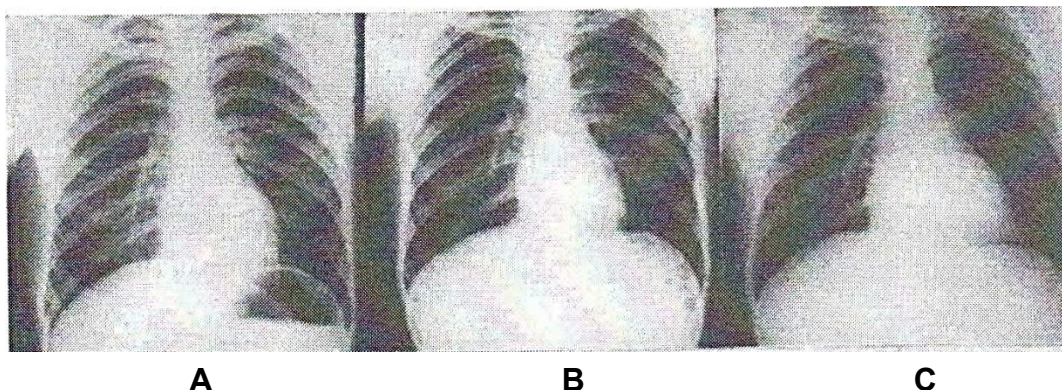


Figura 1. Raio-X mostrando a redução do tamanho do coração durante um regime de subnutrição extrema em humanos. A figura A mostra o tamanho do coração de uma pessoa saudável; B mostra o tamanho do coração após um longo período em regime de subnutrição severa e C mostra a recuperação do órgão após um período de alimentação sem restrição (KEYS *et al.*, 1950).

Estudos recentes do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fisiologia Comparada (INCT-FisC) mostraram que a cascavél sul-americana, *Crotalus durissus terrificus*, é capaz de enfrentar longos períodos de privação alimentar sem apresentar redução na taxa metabólica e com lenta perda de massa. Durante um ano de privação total de alimento, tendo apenas livre acesso à água, os animais mantiveram a taxa metabólica padrão (em 15, 20 e 30°C) inalterada. Ao término desse período, os animais apresentaram a capacidade de aumentar a taxa metabólica durante atividade forçada ou espontaneamente e, após a alimentação, foi registrado o característico incremento metabólico pós-prandial e a digestão normal de presa equivalente a 30% da massa de cada serpente (CLÉO LEITE *et al.*, dados ainda não publicados).

Mesmo com manutenção metabólica, uma perda equivalente a 30% da massa corpórea total em um período de jejum indica a entrada na fase 3 do jejum nesses animais. Isso levanta uma interessante questão acerca de como o músculo cardíaco teria suas funções alteradas (se é que isso ocorre)

para prover a manutenção normal do metabolismo, ou mesmo a elevação metabólica para atividade/SDA, frente a um quadro crítico com a depleção de proteínas estruturais e funcionais para o fornecimento energético, característico da fase 3 do jejum.

8.3. Hipertrofia Cardíaca e Digestão

O processo de hipertrofia cardíaca acontece em resposta a um aumento do trabalho que é imposto ao coração, sendo utilizado frequentemente como um artifício para evitar uma sobrecarga do sistema contrátil diante de alterações nas demandas metabólicas. No entanto, o processo de hipertrofia não é inteiramente benéfico. Há uma grande discussão sobre se esse é um processo que ofereceria uma vantagem funcional ou seria simplesmente um processo adaptativo que, quando prolongado, poderia levar à insuficiência cardíaca (KANDEL, 1969; LEVY *et al.*, 1990; VAKILI, 2001). Diante destas questões, a hipertrofia do miocárdio foi dividida em dois tipos, baseados em características funcionais: a hipertrofia fisiológica, definida como aquela que mantém ou aumenta a capacidade contrátil da célula; e a hipertrofia patológica, como aquela associada à depressão da função contrátil, sem necessariamente levar à insuficiência cardíaca (WIKMAN-COFFELT *et al.*, 1979).

Outra forma de diferenciar a hipertrofia cardíaca foi descrita por Anversa (1986a). Esse autor propõe que a hipertrofia pode ser concêntrica, quando ela ocorre em resposta a uma sobrecarga de pressão e há alteração na espessura da parede ventricular. Nesse processo, porém, não há alteração no volume da câmara. Ou pode ser excêntrica, quando acontece em resposta a uma sobrecarga de volume, alterando o volume da câmara sem afetar a espessura da parede ventricular.

A hipertrofia cardíaca é um processo bastante complexo e pode variar de acordo com o tipo de estímulo, o grau em que este estímulo é aplicado, o tempo de duração, em qual câmara cardíaca este estímulo age e os mecanismos compensatórios utilizados em cada espécie (COOPER, 1987).

Na hipertrofia não há uma mera alteração de tamanho. Alterações nas propriedades dimensionais do miócito implicam em uma série de ajustes para que o órgão não entre em colapso. Conforme a hipertrofia evolui, acontece uma redução na proporção de ATP/ADP no miócito cardíaco, indicando que há menos energia disponível para utilização. Isso funciona como um “feedback” para a síntese de proteínas mitocondriais no tecido estressado e faz com que haja um aumento em número e tamanho das mitocôndrias a fim de suprir o aumento na demanda metabólica (SCHREIBER *et al.*, 1973; MEERSON, 1969). Esta alteração acaba induzindo o aumento na concentração de ADP e conseqüente aumento na fosforilação oxidativa, elevando a captação de substrato mitocondrial e aumentando a produção de energia (MEERSON, 1969). Além disso, observa-se uma reestruturação da rede capilar, com a formação de novas unidades capilares e alterações no fluxo sanguíneo coronário para manter adequado o fornecimento de oxigênio ao tecido (WEIBEL, 1979).

Entre as hipertrofias cardíacas fisiológicas estão a hipertrofia do miocárdio observada em ratos neonatos e a hipertrofia cardíaca em função do exercício físico. Em ratos neonatos, o crescimento do miocárdio é associado à mudança brusca no fluxo sanguíneo e na resistência do sistema circulatório que acontecem logo após o nascimento, e ao aumento na demanda circulatória em função do rápido crescimento do animal (RUDOLF, 1979). Este amadurecimento do sistema circulatório fetal é marcado por um progressivo aumento na carga de volume a ser recebido por ambas as câmaras ventriculares e um aumento na carga de pressão exercida sobre o ventrículo esquerdo (RUDOLF, 1979). Neste caso, é observada uma combinação entre hipertrofia concêntrica e excêntrica, no qual é registrada uma proliferação e aumento no tamanho dos miócitos que é acompanhada pelo aumento progressivo do fluxo sanguíneo (YUAN, 1966) e aumento na rede capilar, que é ampliada pela formação de novas unidades capilares e aumento do diâmetro da luz do capilar (OLIVETTI, 1980; ANVERSA, 1986a, 1986b; RAKUSAN *et al.*, 1984).

A hipertrofia cardíaca em decorrência da atividade física é resultado do aumento na carga de volume que induz o crescimento da câmara

ventricular (hipertrofia excêntrica). Ratos adultos submetidos ao exercício físico moderado apresentaram um significativo aumento no volume da câmara ventricular esquerda (7%) após 8 semanas de exercício, porém nenhuma alteração na espessura da parede ventricular foi registrada (ANVERSA *et al.*, 1982; 1983). O aumento da câmara se dá, em parte, por meio do alongamento dos miócitos em decorrência da replicação dos sarcômeros em série, visto que não há alteração na área de secção transversal do miócito cardíaco e nem no comprimento dos sarcômeros (GROSSMAN, 1975). Além do alongamento dos miócitos, também é observado um rearranjo espacial das fibras miocárdias que também é responsável pelo aumento no volume da ventricular (LINZBACH, 1960; VITALI-MAZZA, 1972). Com o aumento do volume ventricular, a proporção mitocôndria/miócito permanece constante durante todo o processo de hipertrofia (ANVERSA *et al.*, 1982; 1983). Estes ajustes das estruturas citoplasmáticas responsáveis pela produção e utilização de ATP são uma importante alteração morfológica que pode garantir uma função cardíaca normal ou melhorada diante de uma sobrecarga do sistema contrátil, de forma que qualquer alteração neste processo pode levar a um quadro de insuficiência cardíaca (WIKMAN-COFFELT, 1979; GRANGER *et al.*, 1985).

A rede capilar também é ajustada com a realização de exercícios moderados, havendo um aumento na concentração de capilares no miocárdio. Isso resulta em um aumento no volume e superfície capilar que, em algumas situações, pode ser proporcionalmente maior do que o próprio aumento ventricular (ANVERSA *et al.*, 1983; WRIGHT, 1981). Este aumento na rede capilar em situações como esta serviria como uma proteção contra a isquemia do miocárdio, aumentando o fluxo coronário e diminuindo a distância média de difusão de oxigênio do capilar para o tecido (ANVERSA *et al.*, 1983).

Qualquer falha neste processo de aumento e multiplicação dos sarcômeros, aumento no número de miócitos, alteração das estruturas citoplasmáticas e ajustes da rede capilar pode levar o coração a um quadro de insuficiência e tornar esta hipertrofia de fisiológica em patológica. Além disso, é observado que o decorrente aumento na proporção de tecido conjuntivo e colágeno no miocárdio hipertrofiado pode levar a uma queda na capacidade contrátil do mesmo, configurando uma patologia (MEDUGORAC, 1980).

O processo de hipertrofia fisiológica também pôde ser observado em serpentes durante a digestão em órgãos como fígado, rins, pâncreas, intestino, pulmões e estômago (SECOR & DIAMOND, 1997b). As causas desse processo ainda são pouco conhecidas e podem ser decorrentes do aumento na síntese protéica ou um aumento na concentração de fluidos (SECOR & DIAMOND, 1998; STARCK & BEESE, 2001). Além destes órgãos, Andersen *et al.* (2005) constataram que em *Python molurus* analisadas durante o pico da SDA (48 horas após a ingestão do alimento), ocorre um aumento de 40% na massa muscular ventricular e que esta hipertrofia é naturalmente revertida ao final do processo de digestão. Não foi encontrada diferença significativa na proporção de massa ventricular úmida e seca, indicando que este aumento de massa não ocorre devido à movimentação de líquido para o interior das células. Também não foram observadas alterações nas medições de proteínas totais e aumento na concentração de miofibrilas durante o período de digestão. Apesar disso, foi registrado um aumento na expressão de mRNA para cadeias pesadas de miosina cardíaca. Os autores concluem que a hipertrofia ventricular nestes animais ocorre a fim de melhorar o transporte de oxigênio visando suprir a demanda metabólica alterada pela digestão (ANDERSEN *et al.*, 2005) e poderia explicar a tendência de aumento de até 50% no volume de ejeção sistólica observado em *P. molurus* analisadas a 30°C (SECOR *et al.*, 2000).

Em mamíferos, ao menos aparentemente, a hipertrofia cardíaca é acompanhada por um aumento na contratilidade do miocárdio (GOODKIND *et al.*, 1974), tendo aumentada a atividade da SERCA, otimizando a ciclagem de cálcio (LIMAS, 1978); e aumentada atividade da miosina ATPase estimulada pelo Ca^{2+} nas proteínas contráteis (BANERJEE & MORKIN; 1977). Assim, o processo de hipertrofia observado por Andersen *et al.* (2005) leva a crer que, em répteis, o aumento da massa ventricular é desencadeado da mesma forma que em mamíferos. Seria esperado que um aumento da magnitude de até 44 vezes na taxa metabólica padrão de serpentes (como ocorre em decorrência da digestão de alimento equivalente a 100% de sua massa corpórea) levaria ao aumento da pressão ventricular sistólica e uma sobrecarga de volume, aumentando a tensão na parede dos sarcômeros, levando a um estiramento

das fibras musculares (LAKS *et al.*, 1974). Esse tipo de estresse parece causar a ativação de um aparato genético dos miócitos, resultando em um aumento na síntese de ácidos nucléicos (FANBURG & POSNER, 1968; MORKIN & ASHFORD, 1968), proteínas (SCHREIBER *et al.*, 1966) e miosinas, e induz a síntese de novas miosinas isozimas (FLINK & MORKIN, 1977; FLINK *et al.*, 1979; SCHWARTZ *et al.*, 1978) que caracterizam a hipertrofia das fibras musculares.

Aparentemente, a diferença entre a hipertrofia cardíaca encontrada em mamíferos e répteis encontra-se no tempo de conclusão do processo. Em mamíferos, toda a organização e estruturação para a formação de mais tecido, a conclusão do processo e sua regressão completa pode demorar semanas ou até meses (MORGAN *et al.*; 1987). Em serpentes, no entanto, o crescimento ventricular foi observado apenas 48 horas após a ingestão do alimento e 28 dias depois, o órgão estava novamente no seu tamanho normal (ANDERSEN *et al.*; 2005).

Por outro lado, em uma situação oposta, como quando o organismo encontra-se debilitado por uma situação adversa como o jejum prolongado, pode ocorrer uma diminuição na massa do coração, principalmente na massa do ventrículo esquerdo em alguns mamíferos. Algumas disfunções decorrentes do jejum são transitórias e desaparecem após realimentação, mas algumas podem permanecer dependendo da duração da privação e do estado nutricional (manutenção de proteínas e minerais) do organismo (FISLER, 1992).

As Cascavéis Sul-americanas, no entanto, parecem ser bastante resistentes à privação alimentar, porém pouco se sabe sobre os efeitos que isso pode causar no coração. Em tal processo, o coração deve permanecer até certo ponto íntegro em sua capacidade funcional contrátil, principalmente para poder suprir um aumento de demanda metabólica relacionada ao aumento de atividade para captura da presa ou digestão. Isto seria essencial no momento da realimentação, quando a taxa metabólica eleva-se logo após a ingestão da presa, antes mesmo dos nutrientes serem digeridos e absorvidos. Estudos sobre a contratilidade miocárdica neste grupo podem elucidar vários dos

mecanismos importantes para ajustes funcionais contráteis em situações de extremos metabólicos.

Assim, temos o interessante quadro onde se observa que durante o SDA, para digerir grandes presas, é necessário um aumento metabólico maior que o proporcionado pelo exercício forçado e este perdura por vários dias. Durante o jejum prolongado, haveria redução gradual da capacidade contrátil do miocárdio, porém isso aparentemente não acontece, ou ao menos parece ser retardado em reptéis. Desta forma, o presente trabalho investigou os aspectos funcionais contráteis do músculo cardíaco em serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus*, grupo que possibilitaria o estudo de situações de extremos metabólicos.

9. OBJETIVO

Visto que pouco se sabe sobre os mecanismos adaptativos envolvidos no acoplamento excitação-contração de répteis durante diferentes regimes de alimentação, o presente trabalho buscou descrever estes ajustes utilizando cascavéis da espécie *Crotalus durissus terrificus* submetidas ao jejum prolongado (n = 8; 707 ± 51 g), durante a digestão (n = 8; 728 ± 60 g) e em período pós-absortivo (n = 8; 651 ± 72 g).

Tiras ventriculares dos três grupos foram utilizadas para a avaliação dos seguintes parâmetros, descritos no capítulo 1:

1. A existência de hipertrofia durante o pico de digestão ou possível atrofia ventricular em decorrência do jejum prolongado, quando comparados aos resultados obtidos para o período pós-absortivo.

2. O efeito do aumento da taxa de estimulação sobre a força de contração desenvolvida pelas tiras ventriculares nas diferentes condições nutricionais e a relação desses resultados com o acoplamento excitação-contração dos 3 grupos alimentares;

3. A determinação indireta da importância do retículo sarcoplasmático como fornecedor de cálcio ao aparato contrátil, através da comparação da força de contração obtida na presença ou ausência de rianodina e verificar se há diferença na funcionalidade reticular relacionada ao regime de alimentação;

4. A determinação da capacidade de estoque intracelular de Ca^{2+} durante pausas diastólicas prolongadas (5 min), por meio da medida do desenvolvimento de força da primeira contração após o repouso nos 3 grupos avaliados, em solução fisiológica controle, solução contendo lítio e solução contendo rianodina;

5. A determinação da capacidade máxima de desenvolvimento de força pelo músculo cardíaco por meio da adição de concentrações crescentes de adrenalina nos três grupos experimentais e avaliar se há diferença entre eles;

6. A verificação da importância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) no manejo de cálcio da espécie em relação à condição alimentar do animal.

10. MATERIAL E MÉTODOS.

10.1. Preparações Experimentais

Todos os animais utilizados foram cedidos pelo Jacarezário do Departamento de Zoologia da UNESP, *campus* de Rio Claro - SP.

Como descrito no capítulo 1, com cerca de 7 dias de antecedência dos experimentos, os animais foram transportados do Jacarezário, UNESP –Rio Claro, onde estavam sendo mantidos para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da UFSCar. Ali foram mantidos nas mesmas condições, em sala climatizada a 30°C e fotoperíodo natural.

O grupo Pós-absortivo foi descrito no capítulo anterior. O grupo Digestão foi alimentado regularmente (1 camundongo a cada 15 dias). A última alimentação dos animais foi realizada 34 horas antes do início dos experimentos, para que o coração fosse obtido durante o pico de digestão (ANDRADE, 1997). Para obter o SDA, foram oferecidos ratos Wistar adultos obtidos no Biotério Central da UFSCar, com massa equivalente a 30% da massa de cada serpente.

O grupo em jejum foi mantido em privação total de alimento, com livre acesso a água. Previamente, os animais desse grupo foram inicialmente pesados e alimentados para garantir a mesma condição alimentar para todos antes do experimento. Nesse grupo, foi realizado o monitoramento da perda de massa corpórea por meio de pesagens a cada 20 dias até que fosse registrada perda de 30% da massa corpórea ou que se completasse um ano de privação alimentar.

As preparações experimentais, confecção das tiras ventriculares, equipamentos e softwares utilizados estão descritos no capítulo 1. Desta forma, em todos os protocolos foram avaliados os valores de parâmetros como força de contração (Fc), tempo para o pico de força (TPT), tempo para a metade do relaxamento (THR), taxa de contração (velocidade de contração) e taxa de relaxamento (velocidade de relaxamento). Todos os procedimentos *in vitro*

foram realizados a 30°C. Dessa forma, durante o pico de digestão e após o jejum prolongado, foram investigados:

- Efeito do tempo experimental.
- Tensão pós-pausa
- Aumento da frequência de estimulação.
- Papel do cálcio extracelular.
- Papel do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).
- Efeito da adrenalina.
- Efeito da Rianodina.

10.2. Forma de Apresentação e Tratamento Estatístico dos Resultados.

Os gráficos iniciais mostram os dados brutos de todos os parâmetros avaliados de força de contração ($\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$), TPT (ms), THR (ms), taxa de contração e relaxamento (mN/ms). A partir do teste de Rianodina, os dados estão ilustrados em porcentagem para melhor visualização do efeito da adição dos fármacos sobre a função cardíaca e para melhor comparar os resultados entre os regimes de alimentação.

Os seguintes procedimentos estatísticos foram adotados para a análise dos dados obtidos no presente estudo, utilizando-se o programa Sigmaplot (Versão 11.0, Systat Software, Inc):

- Análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para verificar a existência de possíveis variações na massa relativa do ventrículo. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de p foram $<0,05$.
- ANOVA Two-way seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, para verificar a existência de possíveis variações em decorrência da exposição aos fármacos e a comparação entre os grupos experimentais. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de p foram $<0,05$.

11. RESULTADOS

11.1. Hipertrofia Ventricular

Apesar de registros bibliográficos mostrando que em algumas espécies de serpentes ocorre hipertrofia do músculo cardíaco, principalmente no ventrículo, em função do aumento metabólico que ocorre durante a digestão, esse fato não ocorre em cascavél sul-americana. Não há diferença na massa ventricular (massa do ventrículo em relação à massa corpórea do indivíduo - %) de cascavéis em diferentes regimes de alimentação. O grupo durante o pico de digestão (34 horas após a ingestão do alimento) não apresentou qualquer hipertrofia em relação ao grupo Pós-absortivo (30 dias após a alimentação), nem com o grupo Jejum (1 ano após a última alimentação) (Fig. 2).

Da mesma forma, não foi observada diferença quando comparadas as massas relativas do coração inteiro (em relação à massa corpórea de cada indivíduo – Fig. 3). Dessa forma, pode-se afirmar que a massa relativa do órgão como um todo, átrio e ventrículo, não se altera em função do regime alimentar de cascavéis sul-americanas.

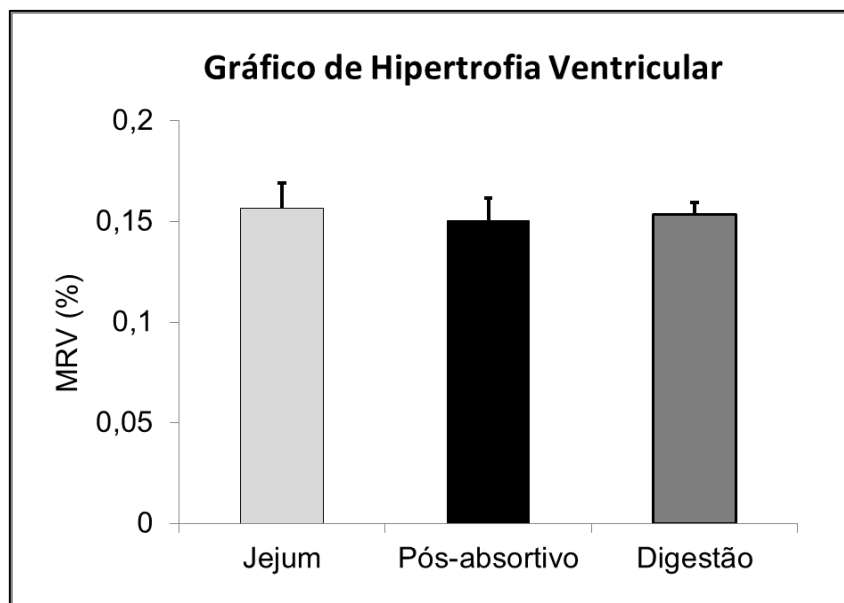


Figura 02. Massa ventricular em relação massa total em três grupos de cascavéis, *C. durissus* (n = 8 em cada grupo): Jejum (Cinza Claro), Pós-absortivo (Preto), Digestão (Cinza Escuro). Os dados são média \pm EPM (ANOVA OneWay, Tukey $p < 0,05$).

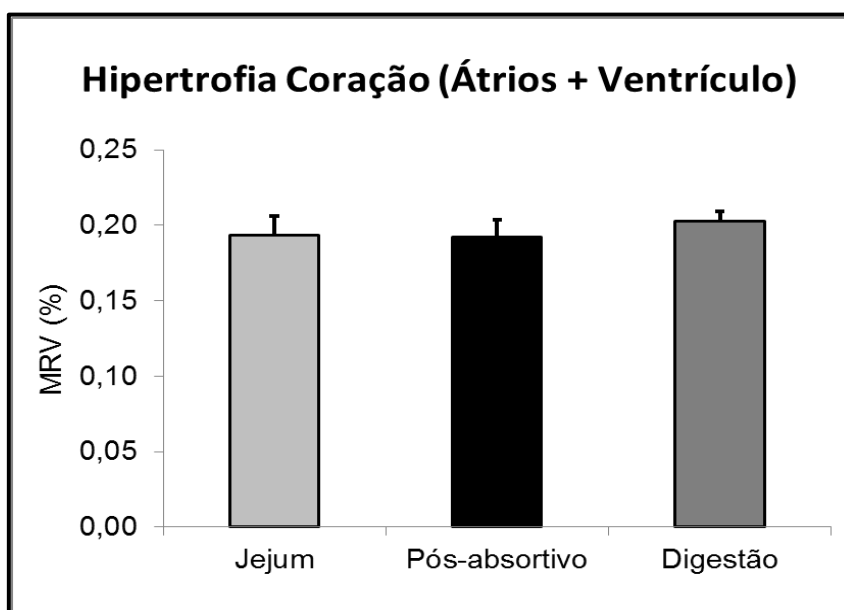


Figura 03. Massa coração em relação massa total em três grupos de cascavéis, *C. durissus* (n = 8 em cada grupo): Jejum (Cinza Claro), Pós-absortivo (Preto), Digestão (Cinza Escuro). Os dados são média \pm EPM (ANOVA OneWay, Tukey $p < 0,05$).

11.2. Relação Força-Frequência: Comparação entre Força da Base e Ápice Ventricular em Diferentes Regimes de Alimentação.

A diferença na capacidade de geração de tensão, bem como nos parâmetros de tempo e velocidades, em todas as frequências de estimulação testadas em tiras da região do ápice e base ventricular, apresentadas no capítulo 1 em animais em regime pós-absortivo, não se alteram de acordo com o regime alimentar dos animais. Esta característica também está presente em todos os parâmetros medidos em animais submetidos ao jejum prolongado ou durante o pico de digestão.

A força de contração gerada pelas tiras do ápice ventricular foi significativamente menor do que a gerada pela base ventricular em todas as frequências de estimulação testadas experimentalmente. Apesar dessa diferença, a geração de tensão nas diferentes regiões do ventrículo não é alterada pelo regime de alimentação dos animais (Fig. 4A e 4B). É possível perceber que em tiras da base ventricular, a força de contração obtida nos 3 regimes alimentares são as mesmas em toda a escala de frequências estimulatórias testadas. Apenas o retorno imediato à frequência inicial de 0,2 Hz é significativamente maior no grupo submetido ao jejum prolongado (Fig. 4A). As tiras do ápice ventricular não apresentaram diferença significativa entre os grupos em todas as frequências testadas, incluindo o retorno a 0,2 Hz.

Apesar do jejum não causar nenhuma alteração aparente no desempenho de força, as tiras tanto do ápice quanto da base ventricular não se contraíram de forma regular em frequências maiores do que 1,6 Hz, enquanto os grupos Pós-absortivo e Digestão mostraram perfeito funcionamento até a frequência de 2,0 Hz (Fig. 4A e 4B). O tempo para o pico de força foi menor no grupo Digestão na frequência inicial de 0,2 Hz, quando comparado aos outros dois grupos em tiras próximas à base ventricular (Fig. 5A). Com o aumento crescente na frequência de estimulação, há um decréscimo significativo no TPT dos 3 grupos analisados, não havendo, no entanto, qualquer diferença entre eles. Apenas o retorno imediato a 0,2 Hz apresentou diferença entre os grupos, quando foi observado que o Jejum apresenta o maior TPT e o grupo Digestão o menor quando comparado aos demais grupos (Fig. 5A).

Com relação às tiras próximas ao ápice ventricular, o decréscimo gradual no TPT em função do aumento na frequência estimulatória também está presente nos 3 grupos, sendo que não há diferença entre eles a partir de 0,4 Hz. Na frequência inicial, o grupo Jejum apresentou um TPT maior do que o registrado no grupo Digestão (Fig. 5B).

O tempo para a metade do relaxamento (THR) nas tiras da base ventricular mostra-se diferente no grupo Jejum em relação ao grupo Digestão entre as frequências de 0,8 Hz - 1,4 Hz (Fig. 6A). O decréscimo gradual com o aumento da frequência estimulatória está presente nos 3 grupos e é significativamente menor do que a frequência inicial já em 0,4 Hz (Fig. 6A). Com o retorno a 0,2 Hz, o grupo Digestão apresentou um THR menor comparado aos demais grupos. Nas tiras próximas ao ápice, o grupo Digestão apresentou um THR maior quando comparado aos demais grupos entre as frequências de 0,2 a 0,6 Hz (Fig. 6B). Há um decréscimo com o aumento na frequência estimulatória em relação ao valor inicial a partir de 0,6 Hz nos grupos Jejum e Digestão, e de 0,4 Hz no grupo Pós-absortivo (Fig. 6B).

A velocidade de contração (taxa de contração) dos grupos não se altera com o aumento na frequência de estimulação e também não foi registrada diferença entre os regimes de alimentação nas tiras da base ventricular (Fig. 7A). Em tiras próximas ao ápice, por outro lado, a velocidade de contração foi menor nos grupos Jejum e Digestão quando comparados ao grupo Pós-absortivo em todas as frequências testadas (Fig. 7B).

A taxa de relaxamento das tiras próximas à base também não apresentou alteração com o aumento da estimulação das tiras, sendo que o valor inicial se manteve em todas as frequências testadas nos grupos Jejum e Digestão, sendo alterado apenas na frequência de 2,0 Hz no grupo Pós-absortivo (Fig. 8A). A diferença entre os grupos está presente apenas na frequência inicial de 0,2 Hz, onde foi registrada uma velocidade de relaxamento menor no grupo Digestão quando comparado ao grupo Pós-absortivo (Fig. 8A). Nas tiras do ápice ventricular, o grupo Pós-absortivo foi mais elevado do que o registrado nos grupos Digestão e Jejum, apresentando uma velocidade de relaxamento maior (Fig. 8B). Assim como acontece na base, o aumento da frequência de estimulação não causa redução na velocidade de relaxamento

nas tiras próximas ao ápice ventricular de nenhum dos grupos testados (Fig. 8B).

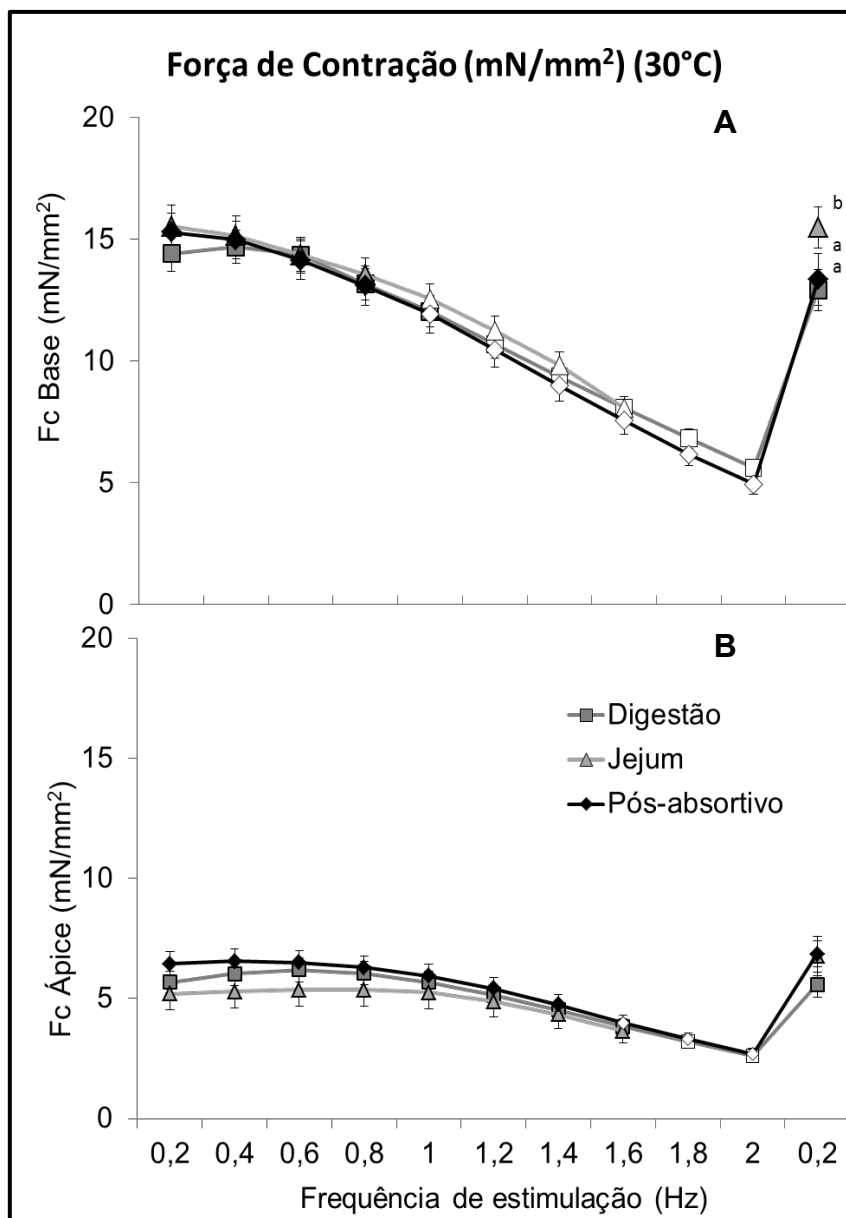


Figura 04. Forças de contração (mN/mm²) registradas durante o contínuo aumento na estimulação de tiras ventriculares de base (**Figura A**; Jejum n= 31, Digestão n=20, Pós-absortivo n=21) e ápice (**Figura B**; Jejum n= 14, Digestão n=28, Pós-absortivo n=24) de cascavél, *C. durissus*, durante o período Pós-absortivo (◇), Digestão (□) e Jejum (△). Os valores são media ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos em uma mesma frequência de estimulação. A ausência das mesmas indica que não há diferença entre os três grupos. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial de 0,2 Hz dentro do mesmo grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

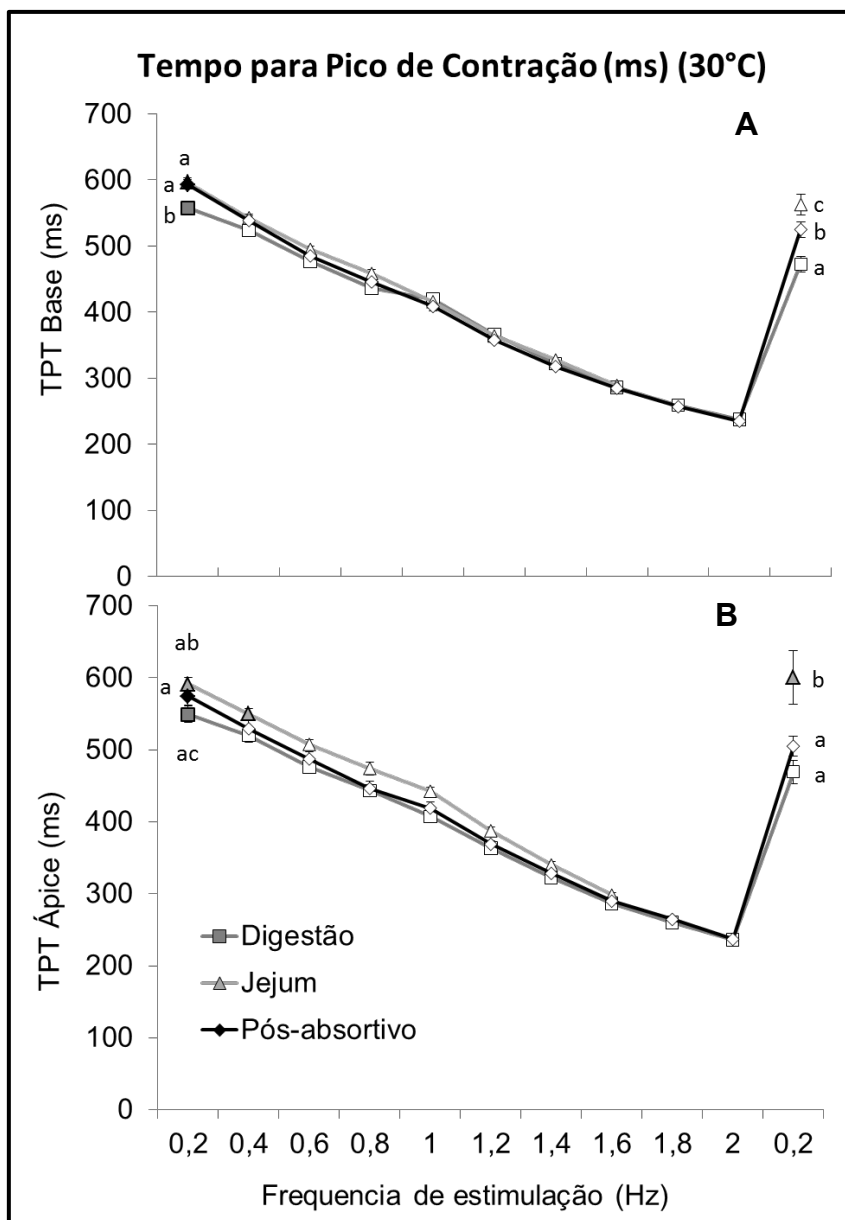


Figura 05. Valores de TPT (ms) registradas durante o contínuo aumento na estimulação de tiras ventriculares de base (**Figura A**; Jejum n= 31, Digestão n=20, Pós-absortivo n=21) e ápice (**Figura B**; Jejum n= 14, Digestão n=28, Pós-absortivo n=24) de cascavél, *C. durissus*, durante o período Pós-absortivo (◇), Digestão (□) e Jejum (△). Os valores são media ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos em uma mesma frequência de estimulação. A ausência das mesmas indica que não há diferença entre os três grupos. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial de 0,2 Hz dentro do mesmo grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

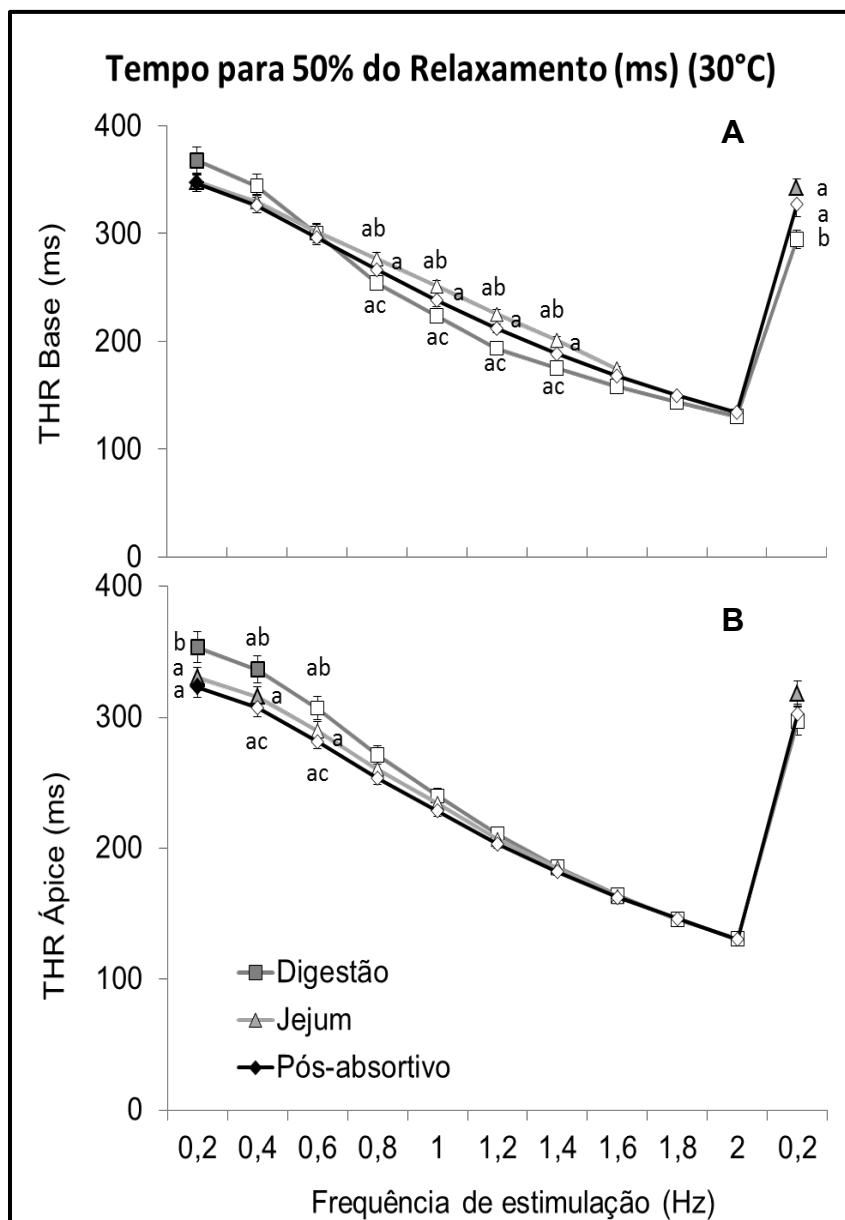


Figura 06. Valores de THR (ms) registradas durante o contínuo aumento na estimulação de tiras ventriculares de base (**Figura A**; Jejum n= 31, Digestão n=20, Pós-absortivo n=21) e ápice (**Figura B**; Jejum n= 14, Digestão n=28, Pós-absortivo n=24) de cascavél, *C. durissus*, durante o período Pós-absortivo (◆), Digestão (□) e Jejum (▲). Os valores são média ± EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos em uma mesma frequência de estimulação. A ausência das mesmas indica que não há diferença entre os três grupos. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial de 0,2 Hz dentro do mesmo grupo (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

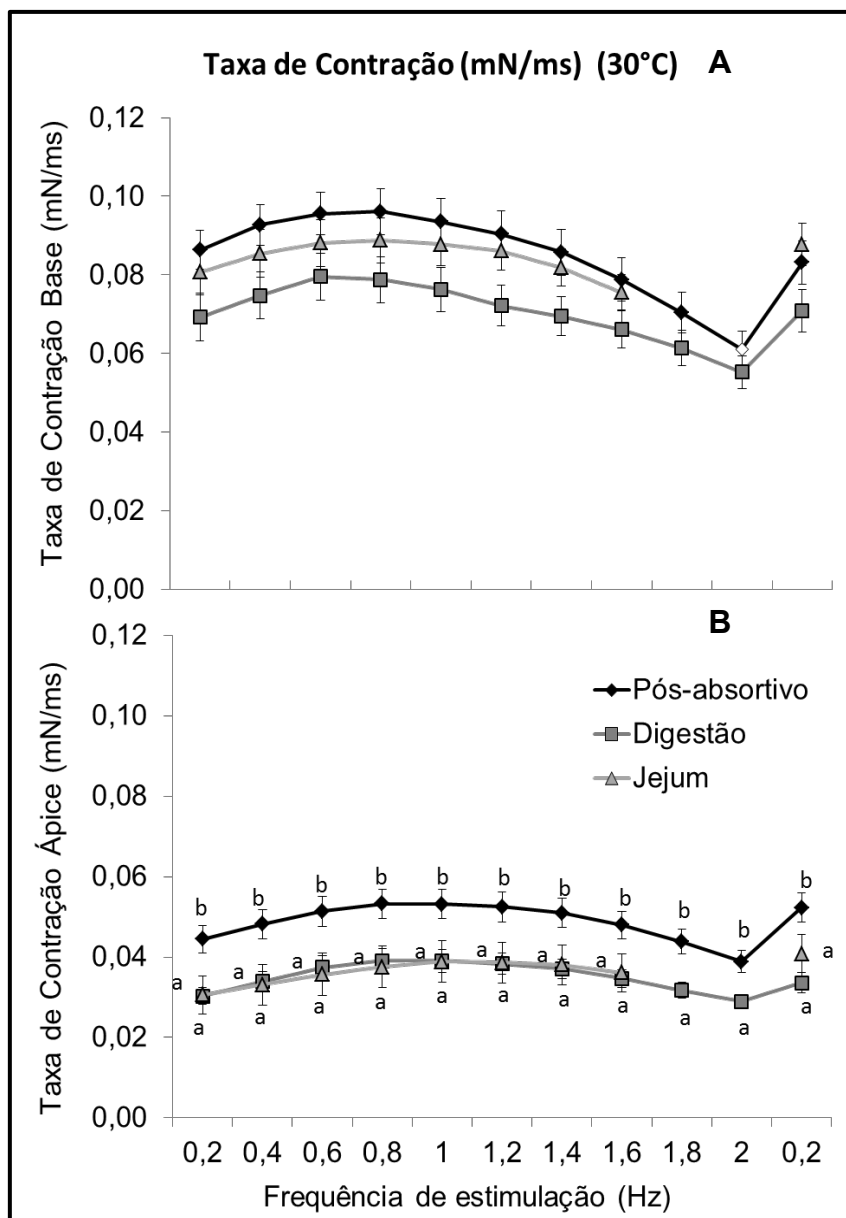


Figura 07. Valores de Taxa de Contração (mN/ms) registradas durante o contínuo aumento na estimulação de tiras ventriculares de base (**Figura A**; Jejum n= 31, Digestão n=20, Pós-absortivo n=21) e ápice (**Figura B**; Jejum n= 14, Digestão n=28, Pós-absortivo n=24) de cascavél, *C. durissus*, durante o período Pós-absortivo (◆), Digestão (■) e Jejum (▲). Os valores são média \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos em uma mesma frequência de estimulação. A ausência das mesmas indica que não há diferença entre os três grupos. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial de 0,2 Hz dentro do mesmo grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

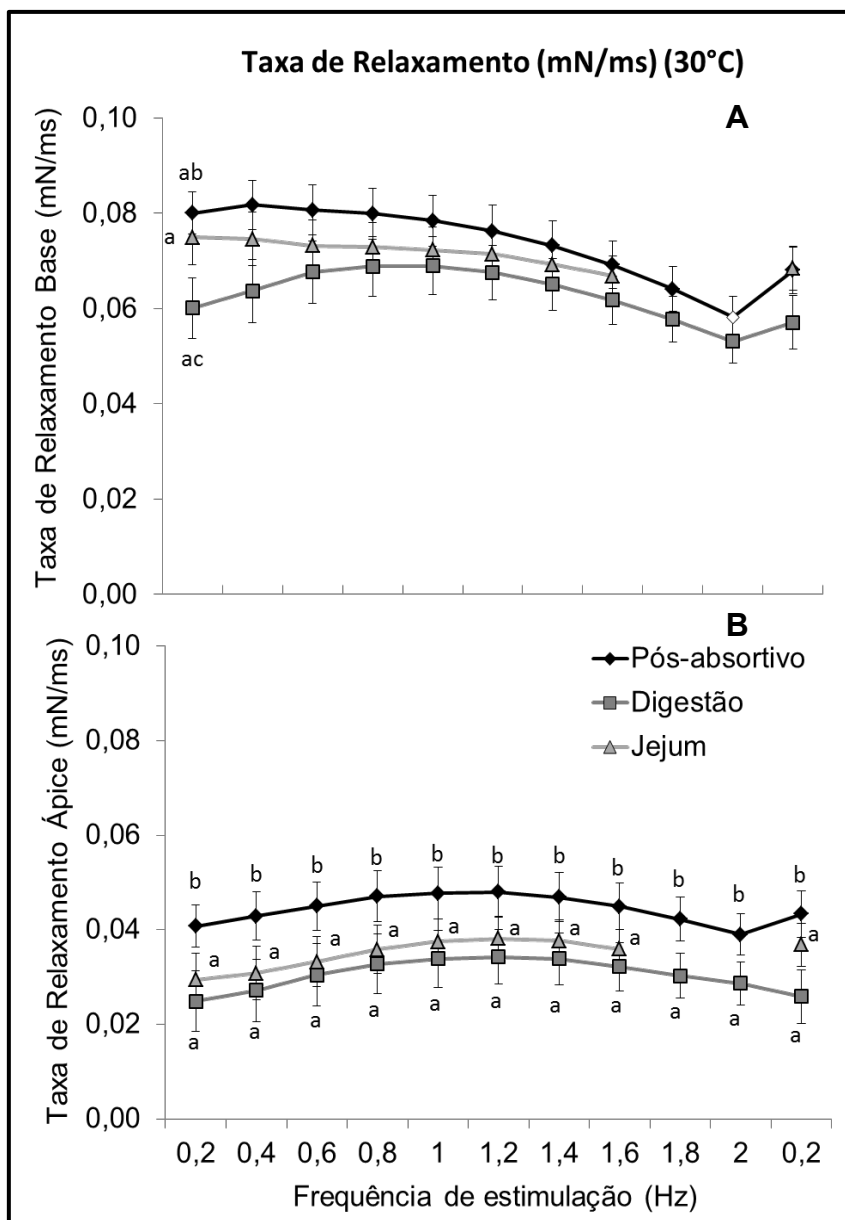


Figura 08. Valores de Taxa de Relaxamento (mN/ms) registradas durante o contínuo aumento na estimulação de tiras ventriculares de base (**Figura A**; Jejum n= 31, Digestão n=20, Pós-absortivo n=21) e ápice (**Figura B**; Jejum n= 14, Digestão n=28, Pós-absortivo n=24) de cascavél, *C. durissus*, durante o período Pós-absortivo (◆), Digestão (■) e Jejum (▲). Os valores são media \pm EPM. As letras indicam a diferença entre os grupos em uma mesma frequência de estimulação. A ausência das mesmas indica que não há diferença entre os três grupos. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial de 0,2 Hz dentro do mesmo grupo (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

11.3. Participação do Retículo Sarcoplasmático no Ciclo Cardíaco:

Apesar da diferença de desempenho contrátil registrada entre as tiras próximas ao ápice e à base ventricular, o decréscimo percentual registrado pelo aumento gradual na frequência de estimulação de ambas as regiões do ventrículo não apresentou diferença significativa em nenhum dos grupos testados. Isso é um indicativo de que o comportamento das tiras e o processo de ciclagem de cálcio são similares em ambas as regiões do ventrículo. Dessa forma, os grupos ápice e base foram unidos para as demais análises e considerações. Os dados foram apresentados em porcentagem e não mais em dados brutos, como ilustrado anteriormente.

A fim de testar a funcionalidade do retículo sarcoplasmático no ventrículo de cascavél sul-americana em diferentes regimes alimentares, as tiras ventriculares dos três grupos estudados foram expostas à solução contendo rianodina e os resultados obtidos estão ilustrados abaixo. Em todos os grupos, a força de contração das tiras caiu significativamente após a exposição ao fármaco quando comparados à situação controle de cada grupo. Nos grupos Pós-absortivo e Digestão, esta queda na força de contração na frequência inicial de 0,2 Hz foi de cerca de 40% e no grupo Jejum a queda foi de 20%. Com o aumento na frequência de estimulação das fibras, foi observado o mesmo efeito “escada negativo” descrito na situação controle, sendo que nos grupos Jejum e Digestão esta queda passa a ser significativa em relação ao valor inicial apenas na última frequência testada de 1,6 Hz e 2,0 Hz, respectivamente (Fig. 9A e B), enquanto que no grupo Pós-absortivo, essa redução passa a ser significativa em 1,4 Hz (Fig. 9C).

Na figura 9D está ilustrada a comparação de capacidade de geração de tensão entre os diferentes regimes de alimentação. É possível perceber que nas frequências de 0,6 e 0,8 Hz, o grupo Digestão apresentou um desempenho maior de geração de tensão quando comparado aos outros dois grupos. Nas demais frequências, os valores se igualam entre os grupos, não havendo qualquer diferença entre eles até o retorno imediato de 0,2 Hz. Nesse momento, o grupo Jejum apresenta força relativamente maior do que a dos outros dois grupos.

Após o bloqueio do retículo sarcoplasmático, foi observado que o grupo submetido ao jejum apresenta uma maior capacidade de gerar tensão quando comparada ao grupo Pós-absortivo entre as frequências de 0,6 Hz e 0,8 Hz. Ao atingir a frequência de 1,0 Hz, a força de contração do grupo Digestão de iguala ao grupo Jejum e ambos mostraram-se mais elevados do que os valores registrados no grupo Pós-absortivo até 1,2 Hz. Após esta frequência, os valores se igualam entre os grupos, não havendo diferença significativa entre eles (Fig. 9E). O retorno imediato a 0,2 Hz também mostra que as tiras do Jejum e Digestão se recuperam mais rápido do aumento na estimulação do que tiras do grupo Pós-absortivo.

Na figura 10, pode-se observar os valores de tempo para a contração nos diferentes grupos alimentares, antes e depois da exposição à rianodina. Apesar da redução significativa na força de contração após o bloqueio do retículo sarcoplasmático nos 3 grupos analisados, não há diferença nos valores de TPT em relação ao controle nos grupos Digestão e Jejum, em nenhuma das frequências avaliadas (Fig. 10A e B). No grupo Pós-absortivo, o TPT é mais elevado nas tiras expostas à rianodina entre as frequências de 0,2 Hz - 1,0 Hz (Fig. 10C). Comparando a situação controle dos 3 grupos, pode-se notar que nas frequências de 0,8 Hz, 1,8Hz e 2,0 Hz, o TPT do grupo Digestão é significativamente maior do que o registrado no grupo Pós-absortivo. Nas frequências de 1,0 e 1,2Hz, o TPT da digestão é maior do que os outros dois grupos estudados (Fig. 10D). Sob o efeito da rianodina, é possível observar a diferença entre os grupos nas frequências de 0,2 Hz, 0,6 Hz, 0,8 Hz e no retorno à frequência inicial, onde o TPT do grupo Pós-absortivo é maior que o registrado nos outros dois grupos (Fig. 10E).

O tempo para a metade do relaxamento (THR) no grupo Jejum reduziu-se significativamente após a exposição à rianodina em quase todas as frequências testadas (Fig. 11A). Esta redução também está presente no grupo Digestão e Pós-absortivo nas duas frequências iniciais 0,2 e 0,4 Hz (Fig. 11B e C, respectivamente). Ao comparar a situação controle dos 3 grupos, foi possível observar que o THR do grupo Digestão é significativamente menor que o dos grupos Pós-absortivo e Jejum em grande parte das frequências testadas (Fig. 11D). Após a utilização da rianodina, os valores de THR se

igualam entre os 3 grupos, havendo diferença significativa apenas na frequência de 1,0 Hz, onde o grupo Digestão é mais elevado do que os demais (Fig. 11E).

A redução na força de contração de todos os grupos após o bloqueio do RS em relação à solução controle somada ao fato do TPT não se alterar nas duas situações, indicam que há uma alteração na velocidade com que as fibras contraem nas duas situações. Na figura 12 estão ilustrados os valores de taxa de contração comparando a situação controle com o bloqueio pela rianodina nos 3 grupos estudados. É possível verificar que em todos eles, há uma significativa redução na velocidade de contração em todos os grupos e em todas as frequências de estimulação (Fig. 12A, B e C). Ao comparar os dados controle dos 3 grupos, não foi encontrada diferença entre os grupos nem na frequência inicial de 0,2 Hz e nem com o aumento gradual da estimulação (Fig. 12D). Após a o bloqueio do RS, a redução da velocidade foi a mesma entre os grupos, não sendo observada diferença entre eles (Fig. 12E).

A velocidade de relaxamento também foi reduzida em todos os grupos, em todas as frequências de estimulação, após a utilização da rianodina (Fig. 13A, B e C). No entanto, ao comparar a situação controle dos 3 grupos, pode-se perceber que a velocidade de relaxamento durante a Digestão é significativamente maior quando comparada aos grupos Jejum e Pós-absortivo, em grande parte das frequências analisadas (Fig. 13D). Após a exposição ao fármaco, a velocidade de relaxamento se iguala entre os grupos (Fig. 13E).

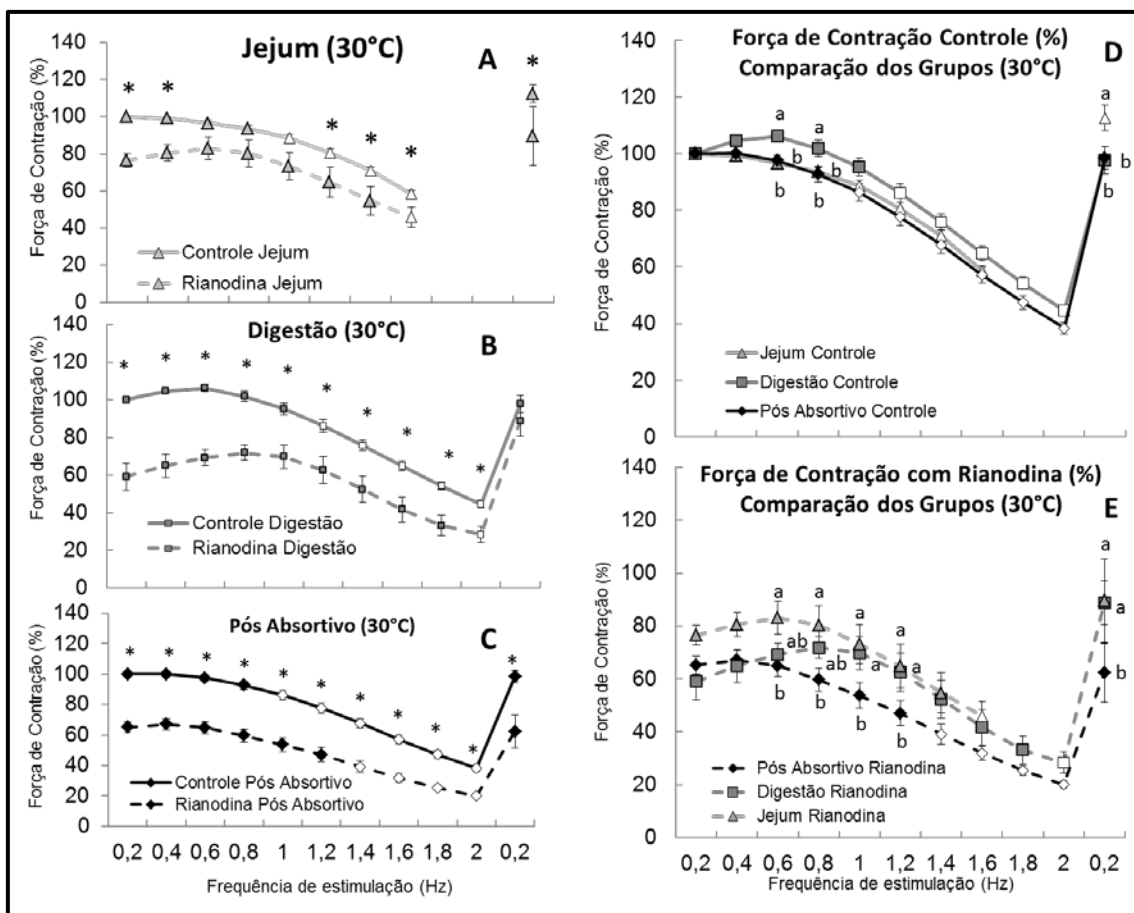


Figura 09. Relação força-freqüência (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com rianodina (Rianodina – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do RS pela exposição à rianodina em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina. (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

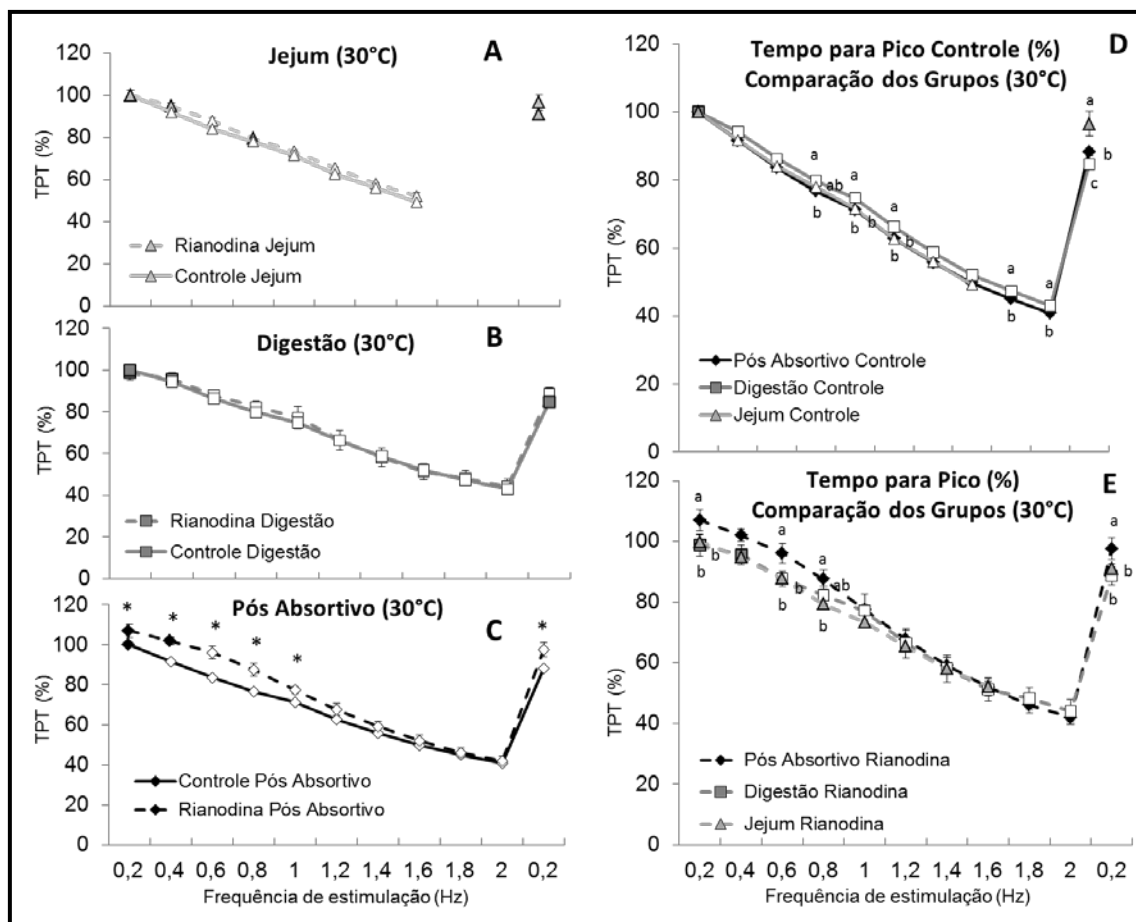


Figura 10. Valores de TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com rianodina (Rianodina – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do RS pela exposição à rianodina em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina. (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

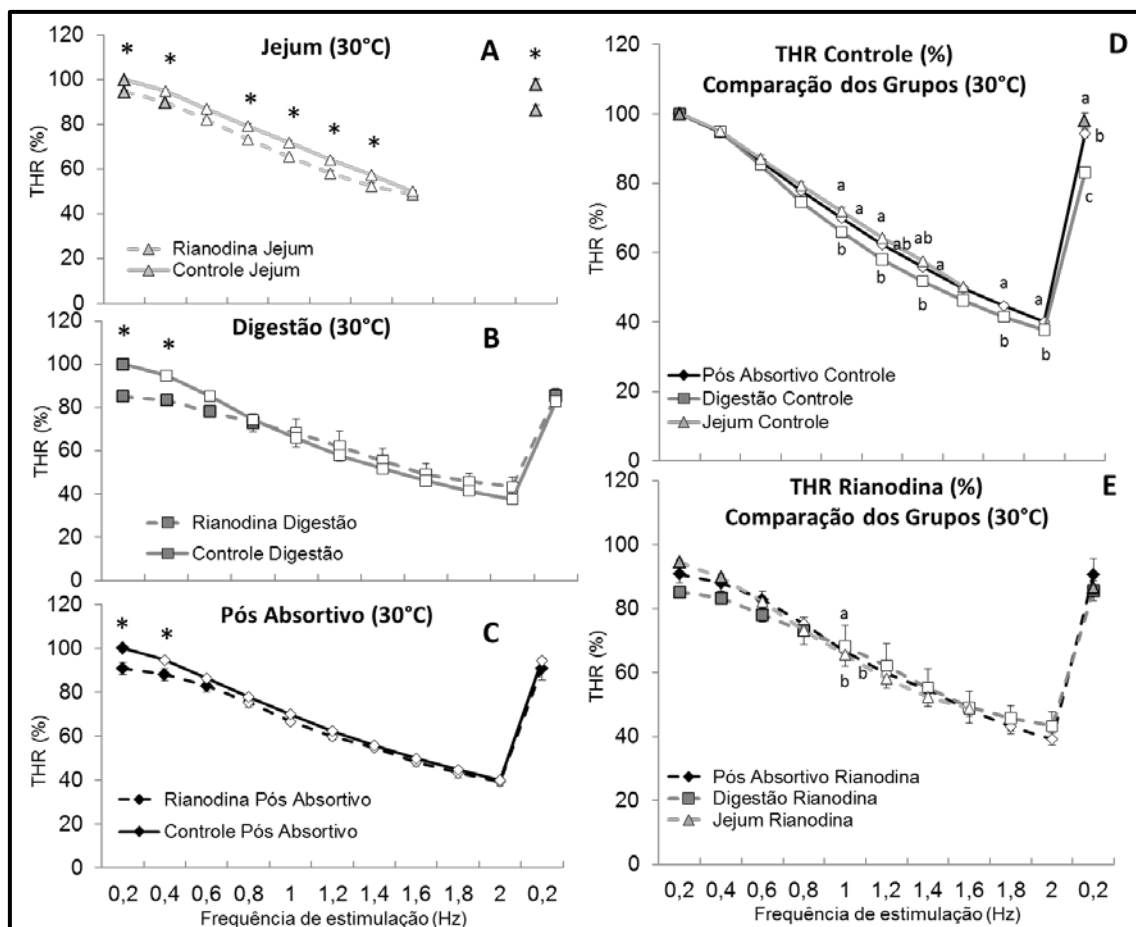


Figura 11. Valores de THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com rianodina (Rianodina – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do RS pela exposição à rianodina em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina. (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

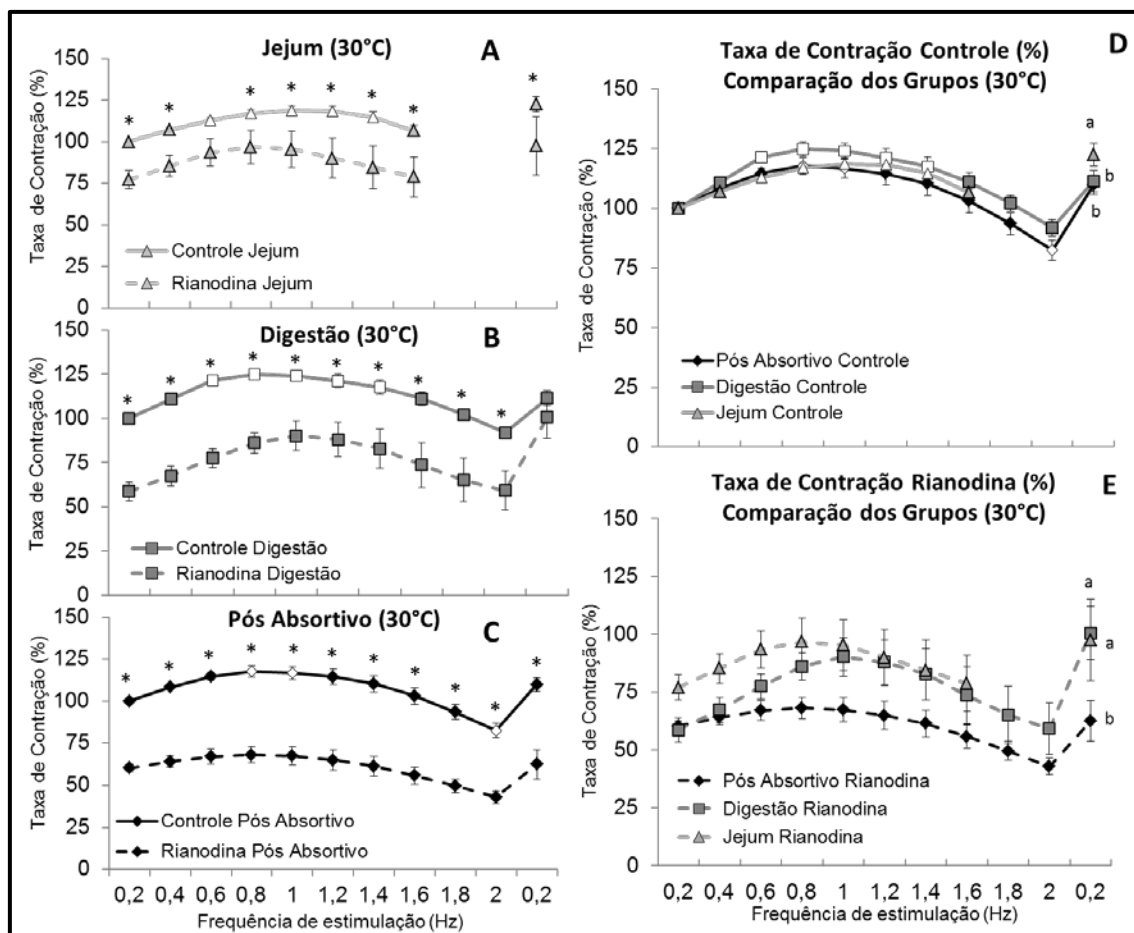


Figura 12. Valores de Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com rianodina (Rianodina – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (□ - **Figura B**) e Pós-absortivo (◇ - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são média ± EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do RS pela exposição à rianodina em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina. (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

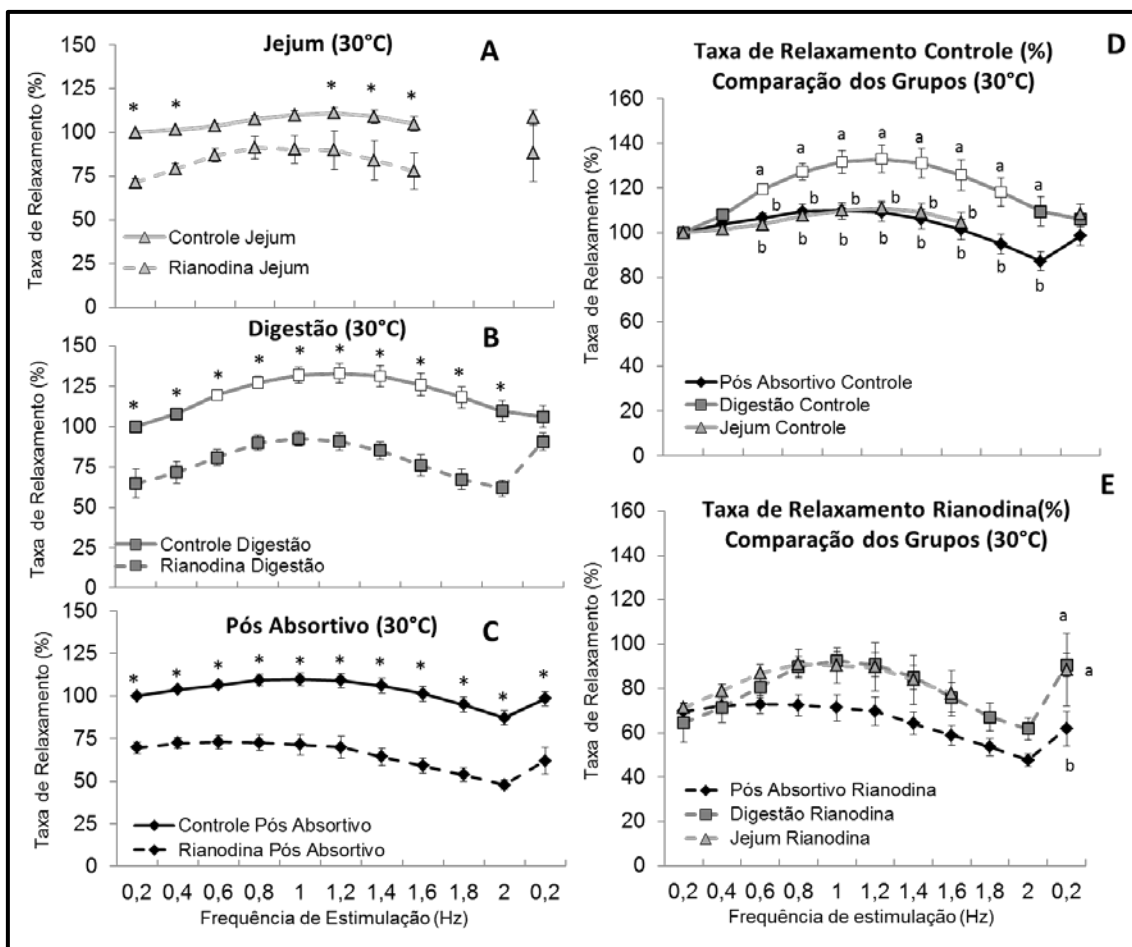


Figura 13. Valores de Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com rianodina (Rianodina – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (□ - **Figura B**) e Pós-absortivo (◇ - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são média ± EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do RS pela exposição à rianodina em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina. (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

11.4. Importância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) na Ciclagem de Cálcio:

Visando avaliar a importância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) na ciclagem de cálcio para a contração do miócito cardíaco de cascavél, a solução fisiológica foi alterada sendo o NaCl substituído por LiCl, na mesma concentração. Com o bloqueio do NCX, há um aumento na força de contração do grupo Jejum na frequência inicial de 0,2 Hz que, com o aumento na frequência estimulatória, desaparece e a Fc passa a ser menor do que a registrada em situação controle (Fig. 14A). Nos grupos Digestão e Pós-absortivo também foi observada uma redução na Fc com o aumento na frequência estimulatória (Fig. 14B e C). Além disso, foi observado que as tiras ventriculares do grupo Pós-absortivo e Jejum não mantiveram a estabilidade de contração em frequências maiores do que 0,8 Hz, enquanto o grupo Digestão mostrou-se estável até 1,0 Hz (Fig. 14A, B e C).

A comparação entre os 3 grupos em solução controle mostrou que a capacidade de geração de tensão é maior no grupo Digestão nas frequências de 0,6 e 0,8 Hz. Em frequências maiores, os valores se igualam e não é possível encontrar qualquer diferença entre os regimes de alimentação (Fig. 14D). Após a exposição ao lítio, o grupo Jejum apresentou Fc maior do que a registrada no grupo Pós-absortivo na frequência inicial de 0,2 Hz. Com o aumento na frequência de estimulação, a queda na geração de tensão iguala os valores entre os grupos até o retorno à frequência inicial (Fig. 14E).

Com a redução na Fc, também foi observado uma redução nos valores de tempo para pico de contração (Fig. 15). Em todos os 3 grupos foi possível observar uma redução no TPT já na frequência inicial de 0,2 Hz em relação à situação controle, e esta característica se mantém com o aumento estimulatório (Fig. 15A, B e C). A comparação entre os valores de solução controle entre os 3 grupos está ilustrada na figura 14D, onde é possível observar que nas frequências de 0,8 Hz, 1,8 Hz e 2,0 Hz, o TPT do grupo Digestão é significativamente maior do que o registrado no grupo Pós-absortivo, e nas frequências de 1,0 e 1,2 Hz, o TPT da Digestão é maior do que os outros dois grupos estudados. Após o bloqueio do NCX, as diferenças de

TPT entre os grupos desaparecem e em todas as frequências testadas foi obtido o mesmo TPT para os 3 grupos (Fig.15E).

Após o bloqueio do trocador, também foram observadas alterações no tempo para a metade do relaxamento da célula (THR). Nas figuras 16A, B e C, é possível perceber que nos grupos jejum e digestão há um significativo aumento no THR em solução controle em todas as frequências testadas. No grupo Pós-absortivo, no entanto, não há qualquer alteração em relação aos valores obtidos antes do bloqueio do trocador. Ao comparar a situação controle dos 3 grupos, pode-se observar que o grupo Digestão é significativamente menor do que o grupo pós absortivo em grande parte das frequências testadas (Fig. 16D). O grupo Jejum, por sua vez, é semelhante a ambos os grupos, mostrando-se maior do que o grupo Digestão na frequência de 1,0 Hz e durante o retorno a 0,2 Hz (Fig. 16D). Após o bloqueio do trocador, a comparação entre os 3 regimes alimentares mostra que os grupos Jejum e Digestão apresentam valores de THR maiores do que os registrados no grupo Pós-absortivo de 0,2 Hz - 0,6 Hz (Fig. 16E).

O bloqueio do trocador também resultou em alterações na velocidade de contração das tiras. É observado um significativo aumento na velocidade de contração no grupo Jejum nas frequências de 0,2 e 0,4 Hz e essa velocidade reduz significativamente em relação à situação controle na frequência de 0,8 Hz (Fig. 17A). No grupo Digestão, também foi possível observar um aumento na velocidade de contração na frequência inicial de 0,2 Hz após a exposição ao lítio no grupo Digestão. Em frequências maiores, a velocidade diminui consideravelmente em relação ao controle (Fig. 17B). No grupo Pós-absortivo, não foi registrado um aumento na força de contração com o bloqueio do trocador. O aumento na estimulação causou apenas uma significativa redução da velocidade em relação ao controle (Fig. 17C). Ao comparar os dados controle dos 3 grupos, não foi encontrada diferença entre os grupos em nenhuma das frequências testadas experimentalmente (Fig. 17D). No entanto, após o bloqueio do trocador, a velocidade de contração do grupo Jejum foi superior àquela registrada no grupo Pós-absortivo na frequência de 0,2 Hz. Em frequências maiores a velocidade se iguala entre os

grupos e não foi encontrada diferença entre os regimes de alimentação (Fig. 17E).

Ao contrário do que acontece com a taxa de contração, a taxa de relaxamento, após a exposição ao lítio, apresentou uma significativa redução em todos os grupos e em todas as frequências testadas (Fig. 18A, B e C). A figura 18D ilustra a comparação dos 3 regimes alimentares em situação controle e nela, é possível notar que a velocidade de relaxamento durante a Digestão é significativamente maior quando comparada ao grupo Jejum e Pós-absortivo, em grande parte das frequências analisadas (Fig. 18D). Essa diferença desaparece após a utilização do lítio e bloqueio do trocador, onde não foi observada diferença na velocidade de relaxamento entre os grupos (Fig. 18E).

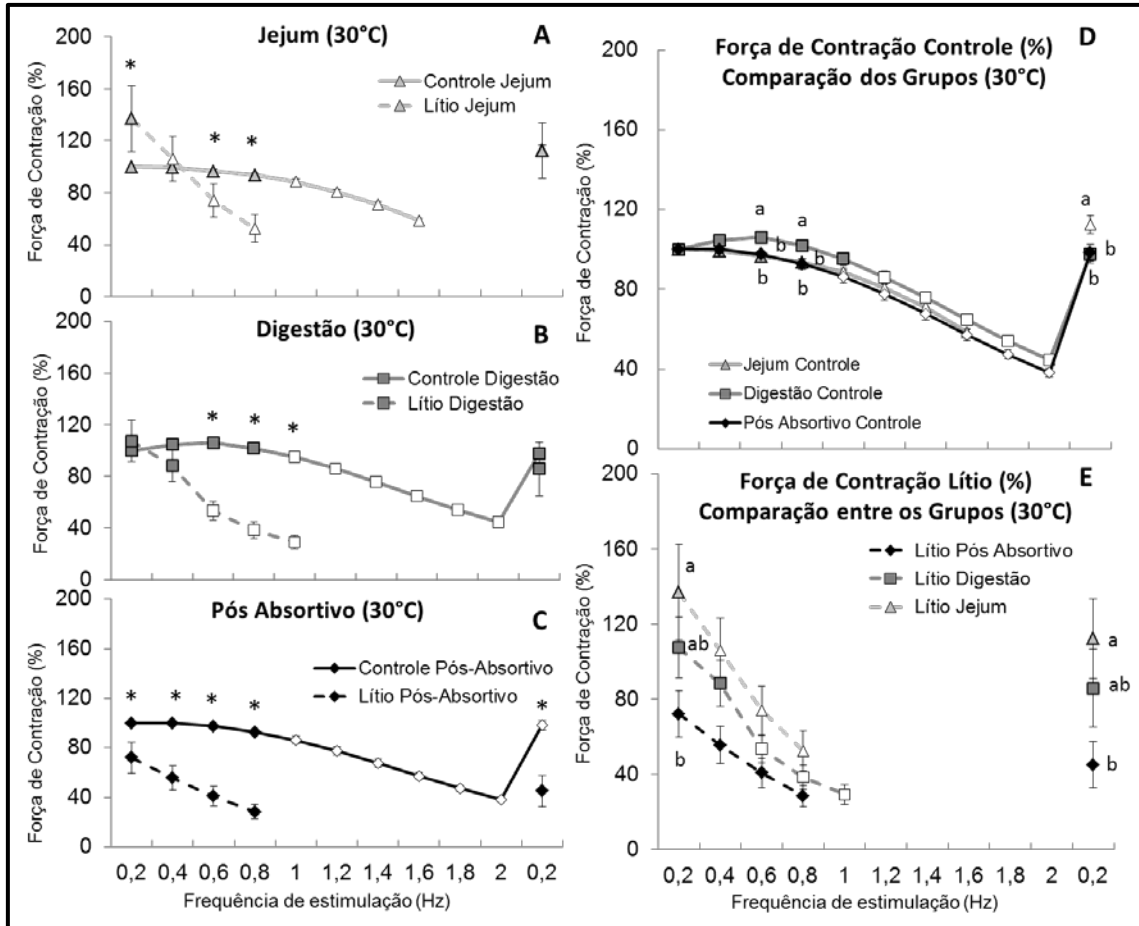


Figura 14. Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com LiCl (Lítio – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do NCX em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição à rianodina. (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

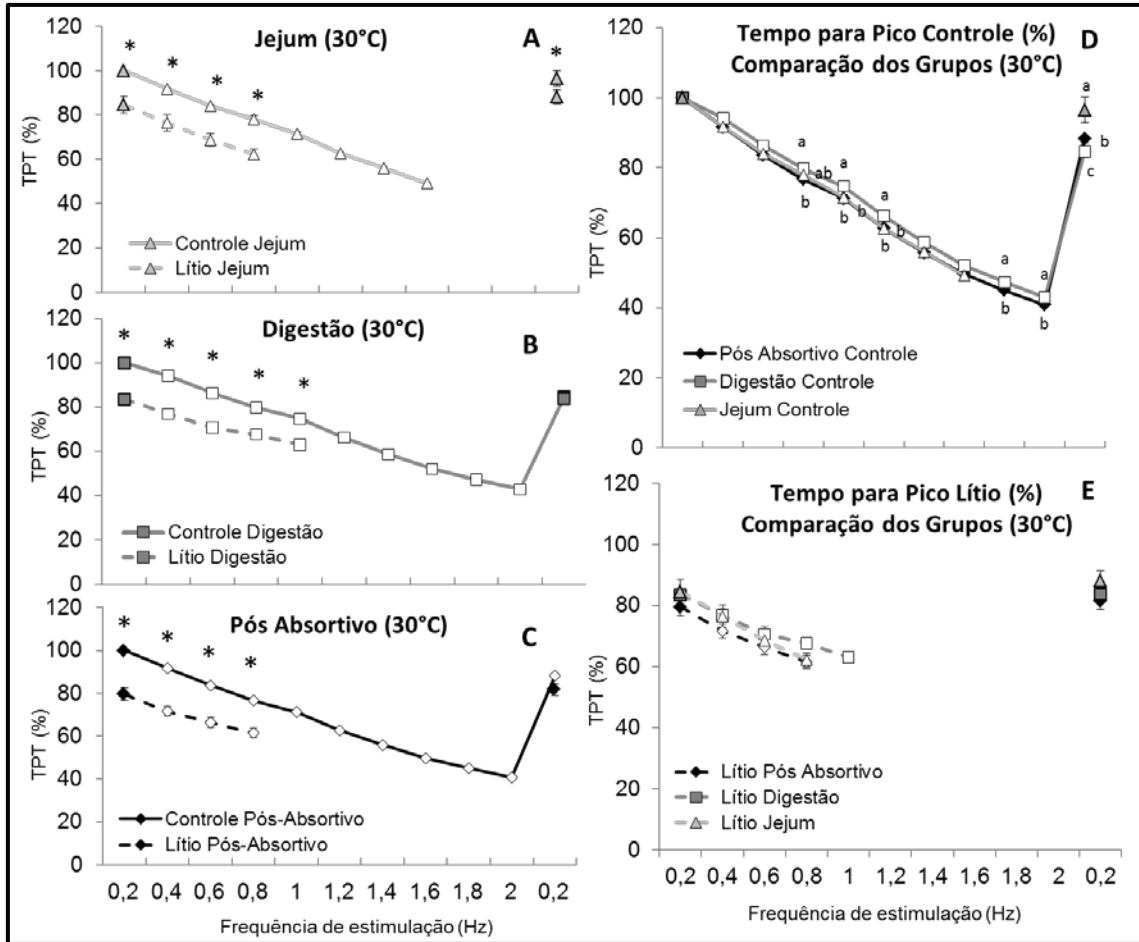


Figura 15. Valores de TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com LiCl (Lítio – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do NCX em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição ao lítio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

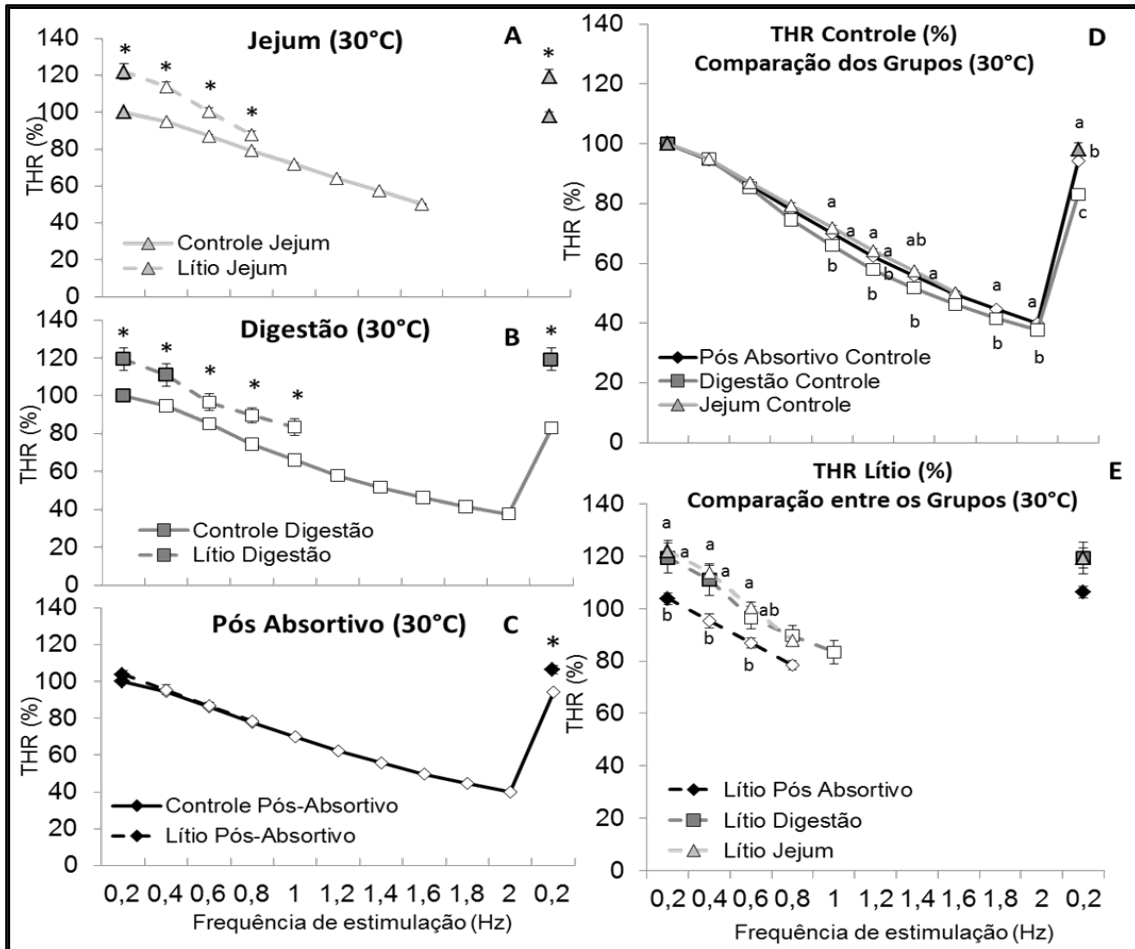
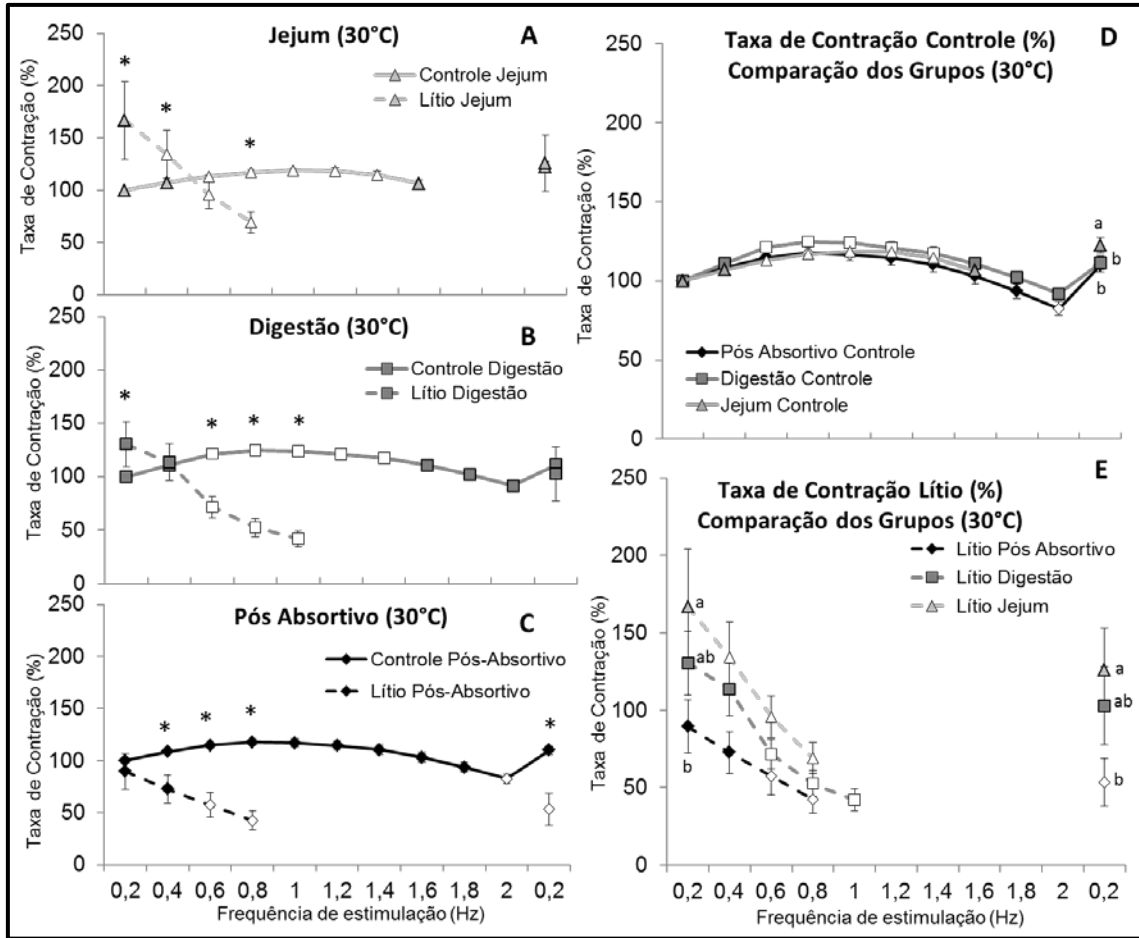


Figura 16. Valores de THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com LiCl (Lítio – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do NCX em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição ao lítio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).



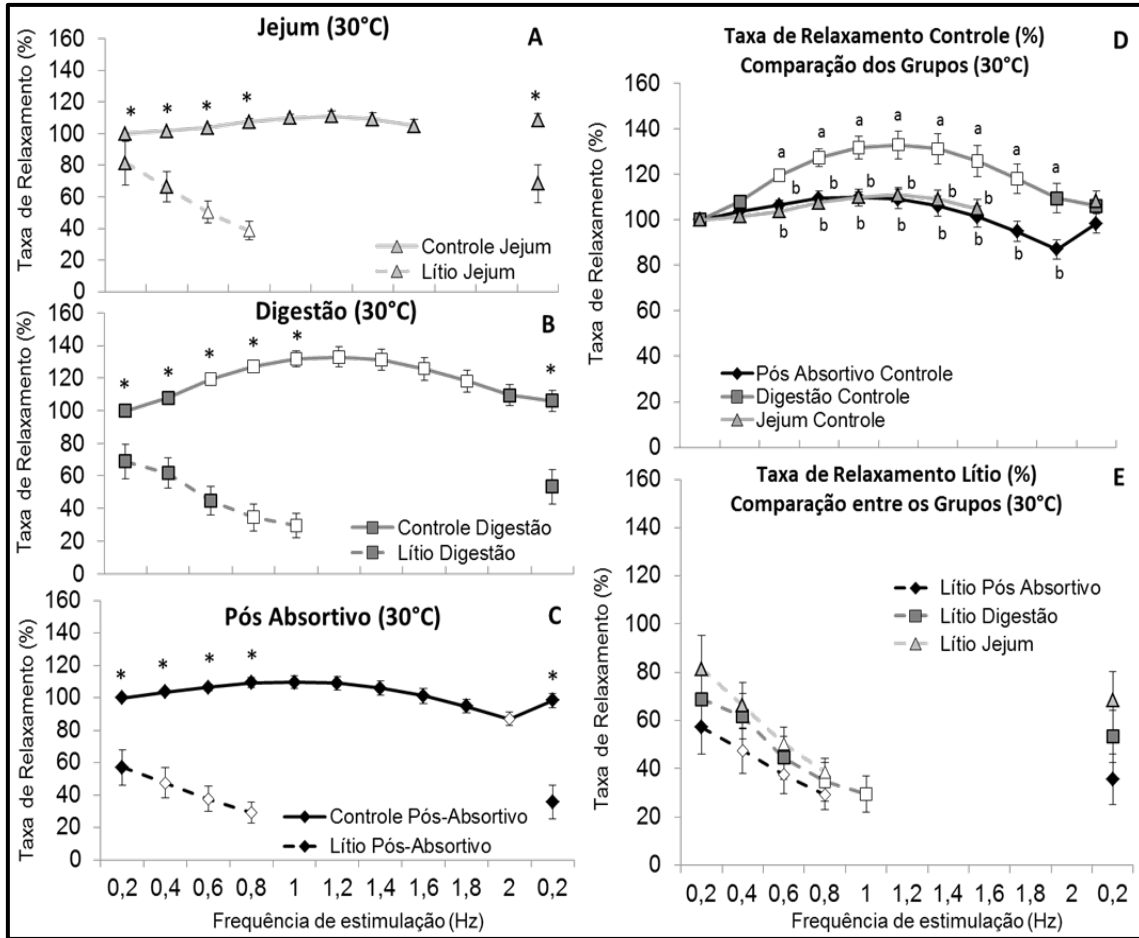


Figura 18. Valores de Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com LiCl (Lítio – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação após o efeito da droga (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o bloqueio do NCX em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após a exposição ao lítio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

11.5. Importância do Cálcio Extracelular:

Para avaliar uma possível relação entre a dependência do cálcio extracelular e o regime alimentar e suas conseqüentes alterações metabólicas, as tiras ventriculares dos 3 grupos estudados foram submetidas ao aumento contínuo da concentração de cálcio presente na solução fisiológica. Nestas condições, foi observado um aumento na Fc acompanhando o aumento na concentração de cálcio. No grupo Pós-absortivo foi observado um aumento significativo em 4 mM de cálcio na solução, e esse aumento é máximo em 6 mM. Em concentrações maiores, a Fc apenas se mantém. No grupo Digestão, o aumento na capacidade de geração de tensão foi maior e contínuo seguindo até a concentração mais alta de 10 mM. O grupo Jejum, por outro lado, apresentou o mesmo aumento na geração de tensão, porém este não foi sustentado em concentrações acima de 6 mM, retornando então aos valores iniciais obtidos na concentração controle de 2 mM. Isso demonstra a diferença significativa em relação aos outros dois grupos. Em 10 mM de cálcio, a Fc entre os 3 grupos passa a ser diferente, sendo que durante a Digestão a Fc é significativamente maior e durante o Jejum é menor do que os demais grupos (Fig. 19).

O tempo para o pico de força também se altera com o aumento na concentração de cálcio na solução fisiológica. Os grupos Digestão e Pós-absortivo apresentaram uma redução no TPT a partir da concentração de 6 mM em relação ao valor inicial de cada grupo. Esta queda se mantém até a maior concentração testada de 10 mM. No grupo Jejum, por outro lado, esta queda no tempo para o pico de força foi mais acentuada e já foi significativa na concentração de 4 mM. A comparação entre os 3 grupos, mostrou que o TPT durante o jejum é menor do que nos outros dois grupos ao longo do aumento na concentração de cálcio (Fig. 20). Esta variação também está presente nos valores de THR dos grupos digestão e pós-absortivo. Em 4 mM, há um aumento no THR destes dois grupos, sendo que com o aumento da concentração de cálcio o THR do grupo Pós-absortivo se mantém. O valor de THR no do grupo Digestão se reduz, retornando ao valor inicial em 6 mM e continua a ser reduzido em 8 e 10 mM de cálcio na solução. O grupo Jejum

não apresentou variação no THR com o aumento da concentração de íons cálcio na solução. Ao comparar os 3 grupos, é possível observar que em 4 mM, os grupos digestão e pós-absortivo possuem um THR maior do que o jejum e em 6 e 8 mM, os grupos jejum e digestão são significativamente menores do que o grupo Pós-absortivo. Em 10 mM, os três grupos são diferentes entre si (Fig. 21).

O incremento de cálcio também resultou em um significativo aumento na velocidade de contração das tiras nos 3 regimes alimentares testados. Só foi observada diferença entre os grupos na concentração de 10 mM, onde a taxa de contração do grupo durante a digestão foi significativamente maior do que o obtido nos outros dois grupos (Fig. 22). A velocidade de relaxamento dos três grupos também acompanhou o aumento na concentração de cálcio. Os grupos Jejum e Pós-absortivo apresentaram aumento na taxa de relaxamento em relação ao valor inicial em 4 mM, que se mantém em 6 mM e depois retorna aos valores iniciais obtidos na concentração controle de 2 mM. O grupo Digestão, por outro lado, mantém o aumento na velocidade com o aumento na concentração de íons cálcio. Em 6 mM passa a ser maior do que os outros grupos e assim continua até a concentração máxima testada (Fig. 23).

Para testar se estas alterações podem perdurar por uma larga escala de frequências de estimulação, as tiras ventriculares foram submetidas ao aumento na estimulação em solução fisiológica contendo 10mM de cálcio. Foi observado que a força de contração registrada durante o jejum manteve-se mais elevada em relação à solução controle apenas na frequência inicial de 0,2 Hz. Em frequências maiores, os valores se igualam entre as duas situações, não sendo registrada qualquer diferença significativa entre elas (Fig. 24A). Outra alteração observada com o aumento na concentração de cálcio extracelular durante o jejum prolongado foi o fato das fibras não resistirem às altas frequências de estimulação, visto que após a frequência de 1,0 Hz, as tiras não conseguem acompanhar a frequência de estimulação e passam a se contrair de forma irregular. No grupo Digestão, foi observado que o aumento de cálcio extracelular faz com que a força de contração aumente e se mantenha mais elevada do que registrado no controle em quase todas as frequências

testadas experimentalmente (Fig. 24B). O grupo Pós-absortivo também apresentou um aumento na F_c , mas assim como no jejum, este só está presente na frequência inicial testada de 0,2 Hz. Em frequências maiores, os valores se igualam aos valores obtidos em solução controle e permanecem assim em todas as outras frequências testadas (Fig. 24C).

A comparação entre os 3 grupos em solução controle mostrou que a capacidade de geração de tensão é maior no grupo Digestão nas frequências de 0,6 e 0,8 Hz comparado aos outros dois grupos. Em frequências maiores e menores que estas, os valores se igualam e não foi encontrada qualquer diferença entre os regimes de alimentação (Fig. 24D). Após a exposição à alta concentração de cálcio extracelular, a comparação dos 3 grupos alimentares mostrou que não há qualquer diferença entre a capacidade de geração de tensão entre os grupos jejum e pós-absortivo em nenhuma das frequências testadas. No entanto, a ciclagem de cálcio mostrou-se menos eficiente durante o jejum prolongado, visto que estas tiras só contraíram em frequências até 1,0 Hz. A partir da frequência de 1,2Hz, a F_c desenvolvida pelo grupo Digestão passou a ser significativamente maior quando comparado ao grupo Pós-absortivo (Fig. 24E).

Apesar da F_c ser mais elevada apenas na frequência inicial de 0,2 Hz durante o jejum prolongado, o TPT manteve-se reduzido em todas as frequências testadas quando comparado aos valores obtidos em solução controle (Fig. 25A). Essa redução no tempo para o pico de força também foi registrado nos grupos digestão (até a frequência de 1,8 Hz; Fig. 25B) e pós-absortivo (até 1,4 Hz; Fig. 25C). A comparação entre os valores TPT dos 3 regimes de alimentação em solução controle está ilustrada na figura 25D, onde é possível observar que nas frequências de 0,8 Hz, 1,8 Hz e 2,0 Hz, o TPT registrado durante a digestão é significativamente maior do que o registrado no grupo Pós-absortivo. Nas frequências de 1,0 e 1,2 Hz, o TPT do grupo Digestão foi maior do que os outros dois grupos estudados (Fig. 25D). Após o aumento na concentração de cálcio externo, não foi observado diferença entre os valores de TPT dos 3 grupos alimentares na maior parte das frequências testadas. Apenas nas frequências de 1,4 Hz e 1,8 Hz, o TPT do grupo Digestão foi significativamente maior do que o registrado no Pós-absortivo (Fig. 25E).

O THR registrado no grupo Jejum foi pouco alterado com o aumento do cálcio externo quando comparado aos valores controle, sendo maior apenas nas frequências de 0,4 Hz e 0,6 Hz (Fig. 26A). No grupo Digestão, por outro lado, na maior parte das frequências testadas (de 0,2 - 1,6Hz), o THR foi menor do que o registrado durante o controle (Fig. 26B). No grupo Pós-absortivo, o cálcio extracelular não causou alteração no THR. Os valores obtidos foram semelhantes ao controle (Fig. 26C). A comparação dos 3 grupos em solução controle mostrou que grupo Digestão é significativamente menor do que o grupos pós absortivo em grande parte das frequências testadas (Fig. 26D). O grupo Jejum, por sua vez, é semelhante a ambos os grupos, mostrando-se maior do que o grupo Digestão na frequência de 1,0 Hz e durante o retorno a 0,2 Hz (Fig. 26D). Após a exposição ao cálcio 10 mM, a comparação dos grupos mostrou que nas frequências iniciais de 0,2 e 0,4 Hz, há uma significativa diferença entre os 3 regimes alimentares. A partir de 0,6 Hz, não foi registrada diferença entre os grupos jejum e pós-absortivo. Contudo, os valores de THR de ambos os grupos são significativamente maiores do que os registrados no grupo Digestão (Fig. 26E).

A velocidade de contração também se eleva após a exposição das tiras ao aumento da concentração de cálcio. No grupo Jejum, a velocidade com que as tiras se contraem foi significativamente maior até a frequência de 0,6 Hz quando comparada à situação controle (Fig. 27A). No grupo Digestão, a velocidade de contração se manteve mais elevada em quase todas as frequências testadas durante os experimentos (Fig. 27B). No grupo Pós-absortivo, a taxa de contração manteve-se mais elevada que o controle apenas nas duas frequências iniciais. Em frequências mais altas, os dois grupos se igualam, não sendo registrada diferença significativa entre eles (Fig. 27C). Ao comparar os dados controle dos 3 grupos, não foi encontrada diferença entre os grupos em nenhuma das frequências testadas experimentalmente (Fig. 27D). Após a exposição às preparações de alto cálcio foi observado que até a frequência de 1,0 Hz, não há diferença significativa entre os grupos alimentares. No entanto, em frequências superiores, o grupo Digestão apresentou uma velocidade de contração significativamente maior do que a registrada no grupo Pós-absortivo (Fig. 27E).

A velocidade de relaxamento do grupo Jejum após a exposição ao cálcio 10 mM manteve-se igual àquela registrada em solução controle durante as 3 primeiras frequências de estimulação. A partir de 0,8 Hz, a velocidade de relaxamento foi significativamente menor do que a registrada no controle (Fig. 28A). Ao contrário do que foi observado no jejum, o grupo Digestão apresentou um aumento na velocidade de relaxamento das fibras musculares quando comparadas a situação controle (Fig. 28B). No grupo Pós-absortivo, a taxa de relaxamento foi igual àquela registrada durante o controle até a frequência de 0,8 Hz. O aumento na frequência de estimulação a partir de 1,0 Hz resultou em uma redução na velocidade de contração quando comparada ao controle (Fig. 28C). A figura 28D ilustra a comparação dos 3 regimes alimentares em situação controle. A taxa de relaxamento durante a digestão foi significativamente maior do que a registrada nos outros dois grupos a partir da frequência de 0,6 Hz. Após a exposição ao cálcio 10 mM, foi observado que não há diferença na taxa de relaxamento dos grupos jejum e pós-absortivo (Fig. 28E). No entanto, a taxa de relaxamento do grupo Digestão foi significativamente maior do que a registrada nos demais grupos em todas as frequências de estimulação testadas experimentalmente (Fig. 28E).

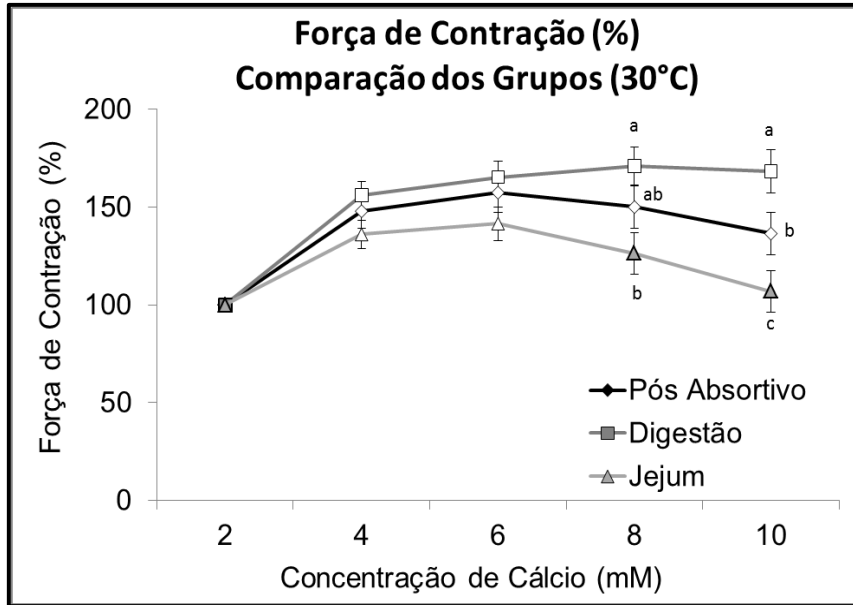


Figura 19. Alteração na força de contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos testados (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

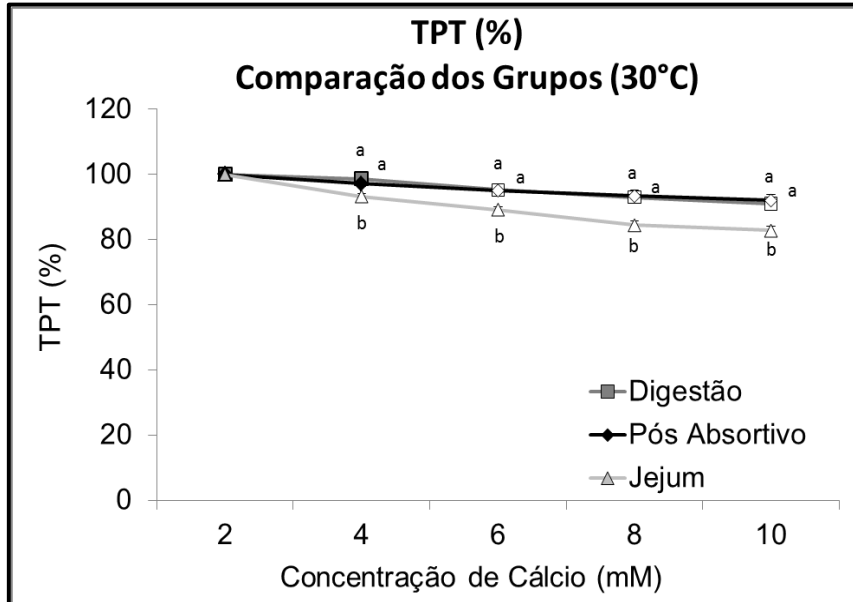


Figura 20. Alteração no TPT (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos testados (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

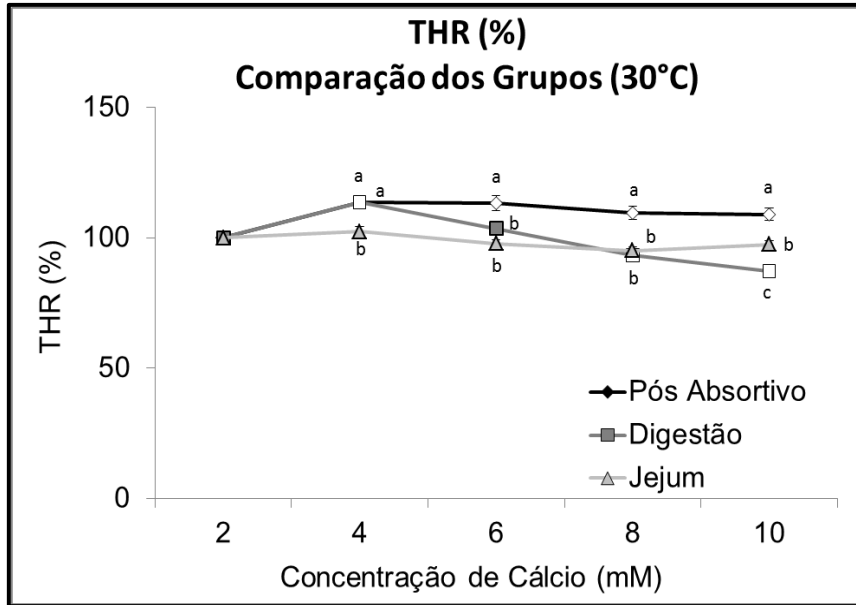


Figura 21. Alteração no THR (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos testados (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

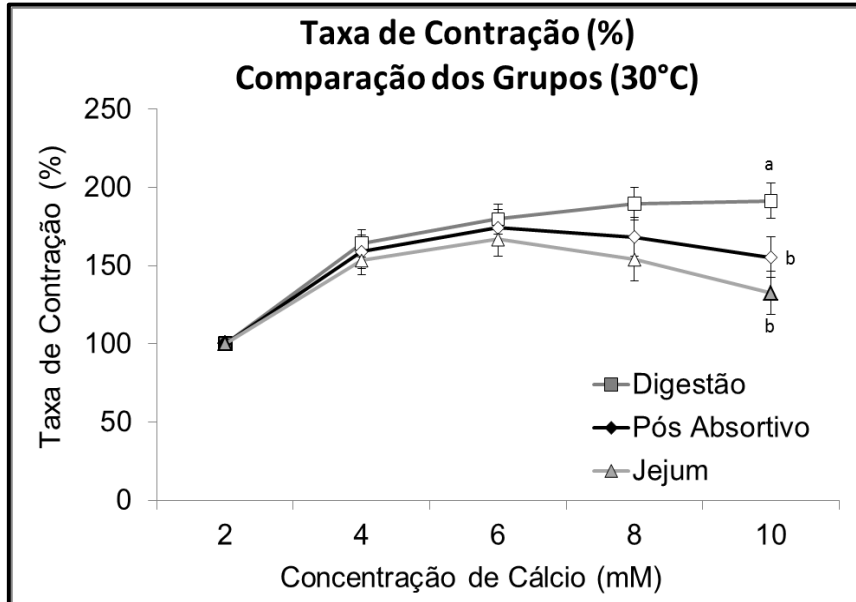


Figura 22. Alteração no Taxa de Contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos testados (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

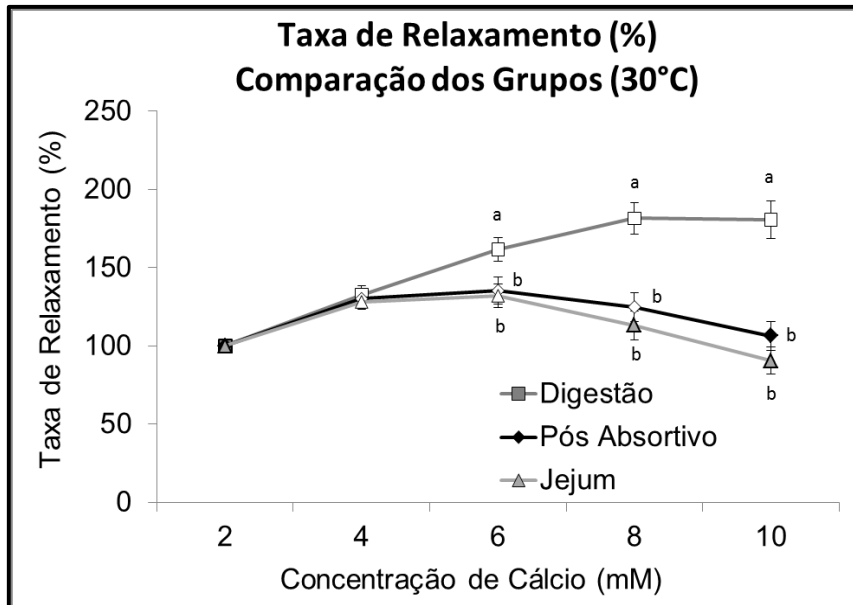
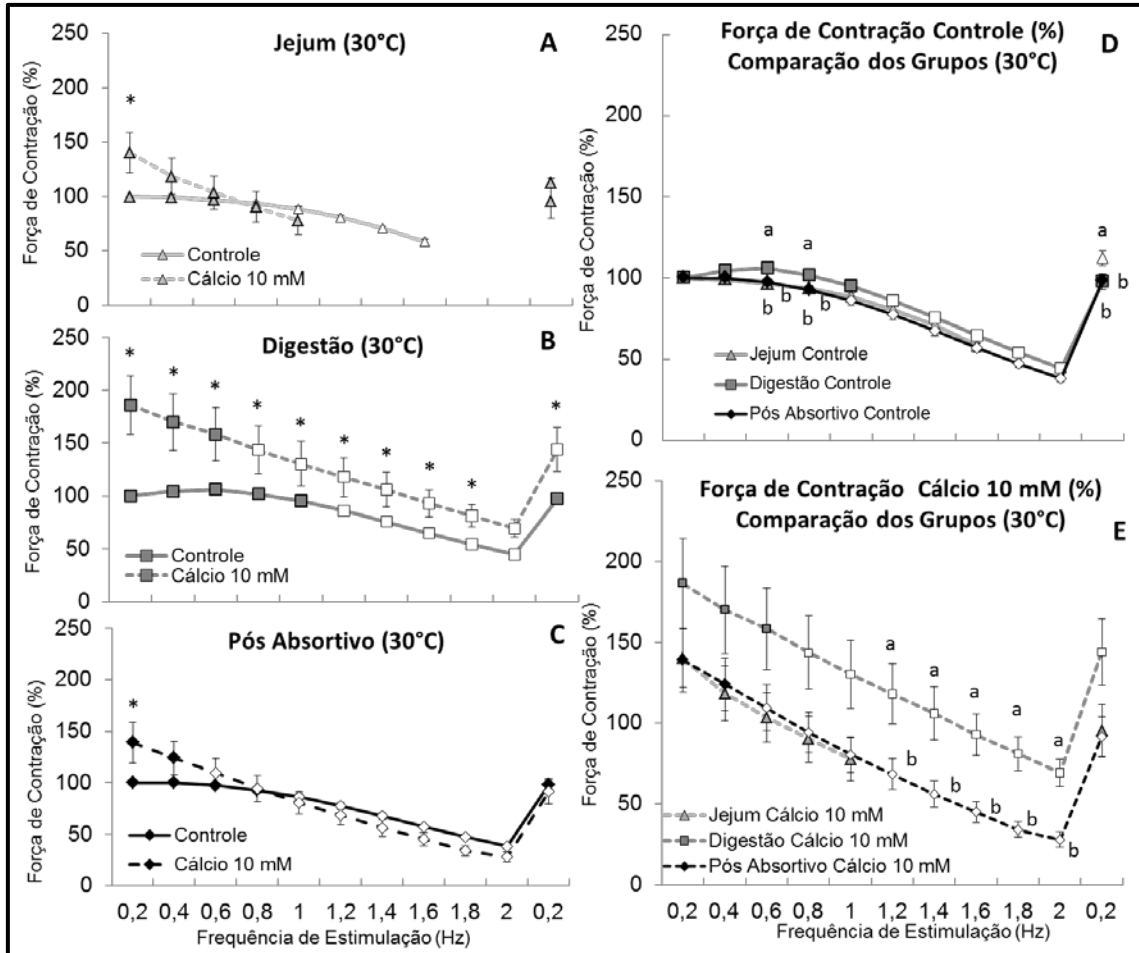


Figura 23. Alteração no Taxa de Relaxamento (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de cálcio e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos testados (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).



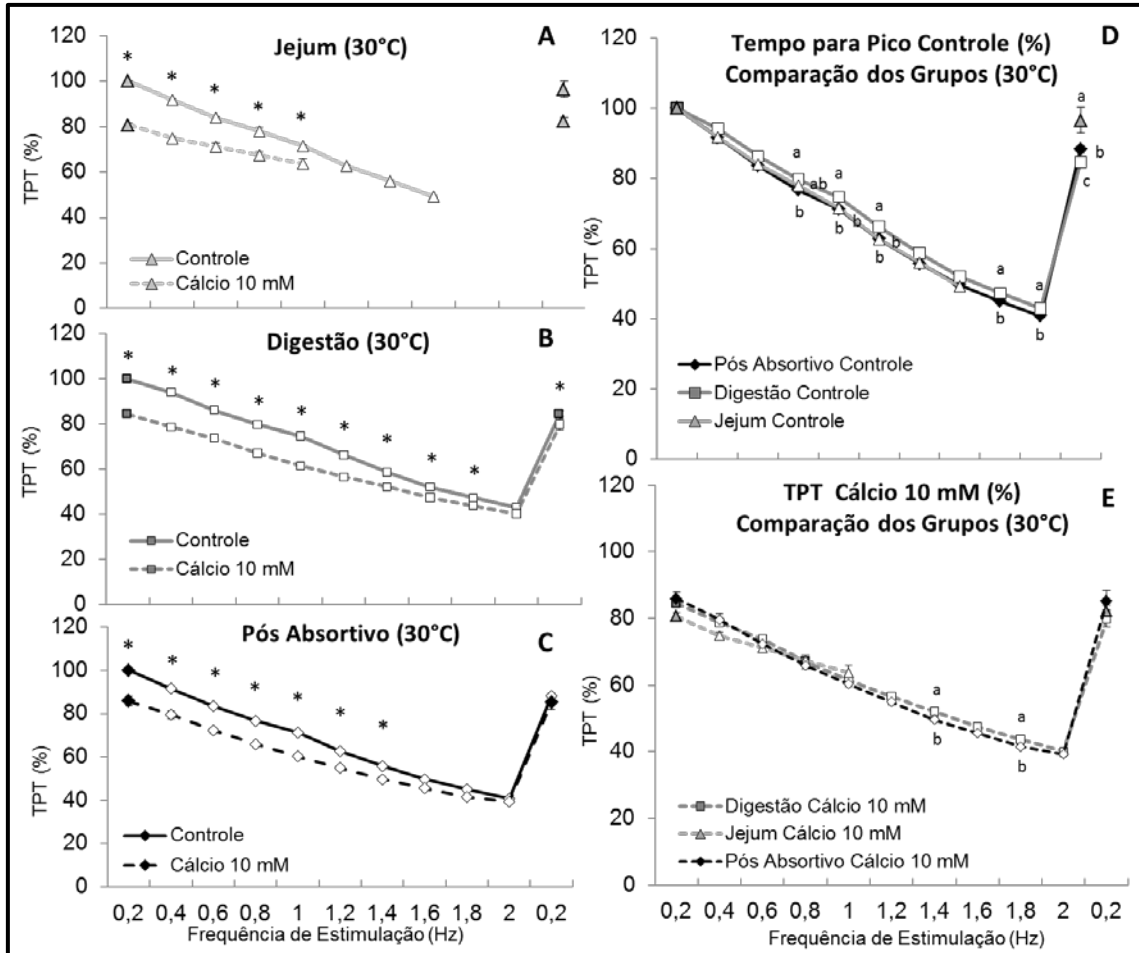


Figura 25. Valores de TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação o aumento do cálcio extracelular (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após o aumento à concentração de cálcio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

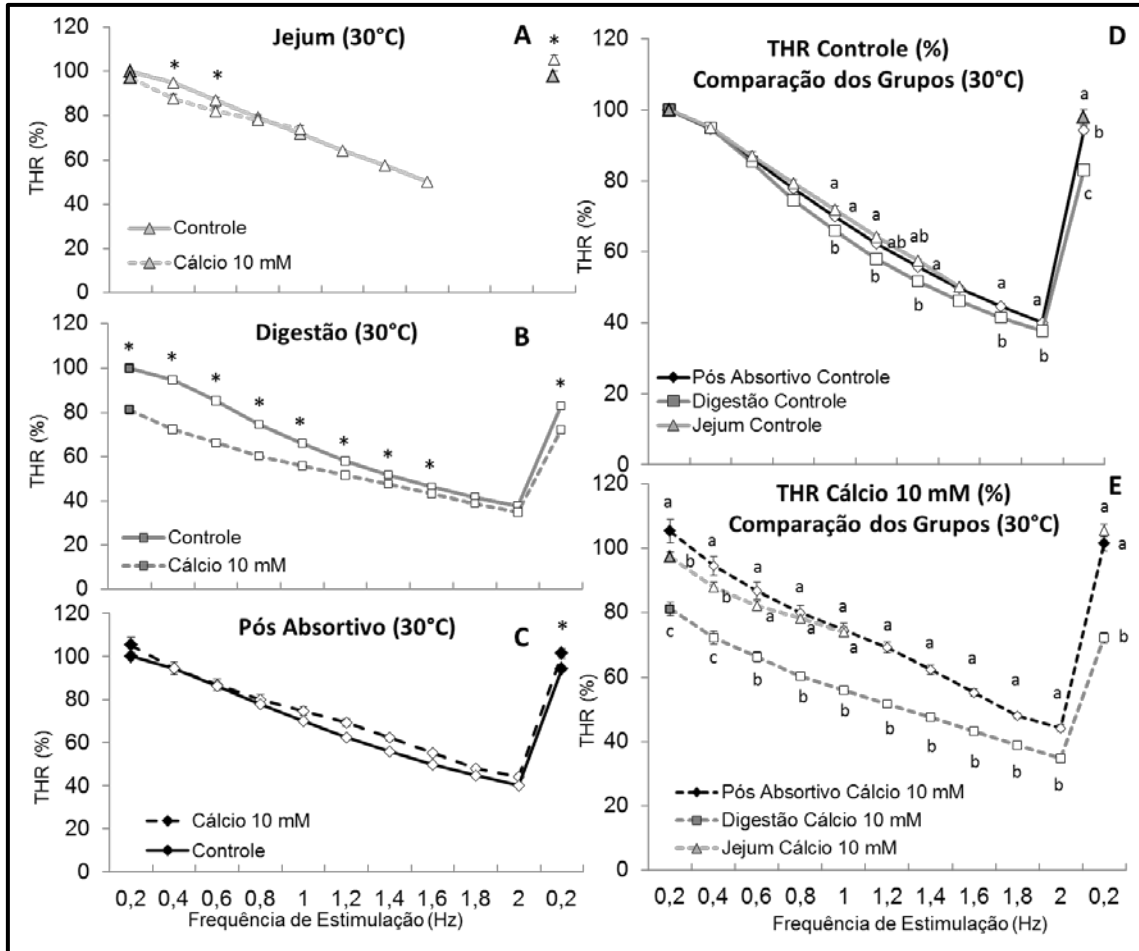
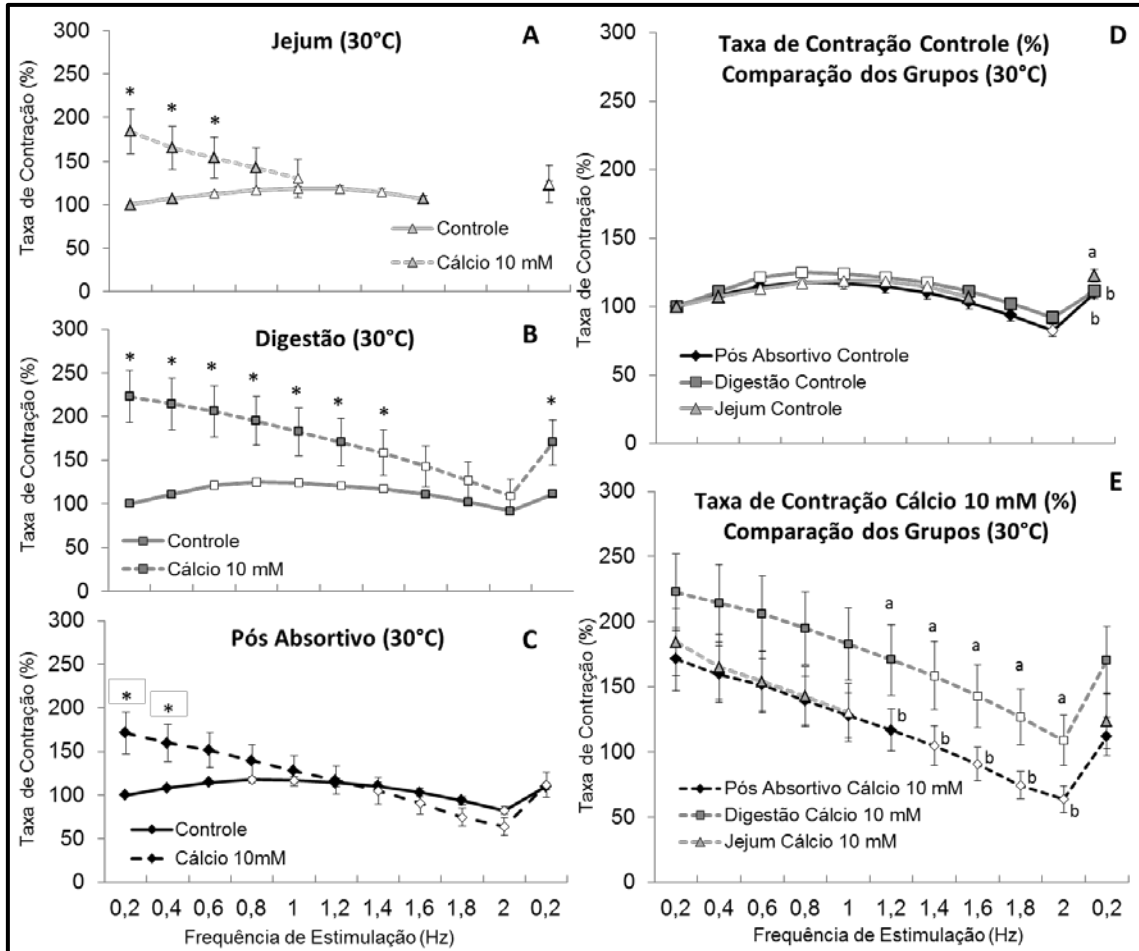


Figura 26. Valores de THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação o aumento do cálcio extracelular (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após o aumento à concentração de cálcio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).



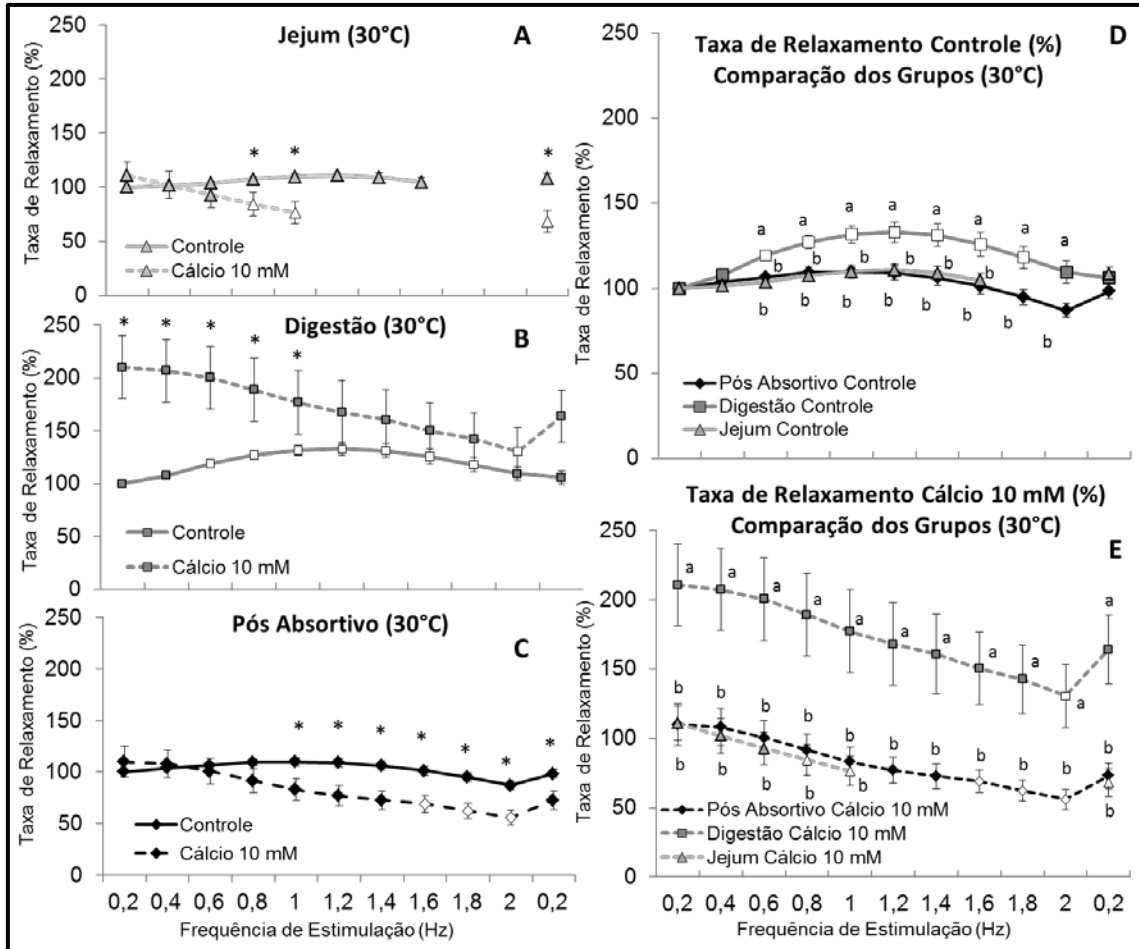


Figura 28. Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha inteira) e com 10 mM de Cálcio (Cálcio 10 mM – linha pontilhada), nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**) e a comparação o aumento do cálcio extracelular (**Figura E**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e após o aumento à concentração de cálcio (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

11.6. Efeito da Adrenalina

Para averiguar a resposta a adrenalina em diferentes regimes de alimentação, as tiras ventriculares dos 3 grupos estudados foram submetidas ao contínuo aumento da concentração de adrenalina na solução fisiológica. A figura 29 ilustra a resposta obtida no teste com os três grupos alimentares, e é possível observar que até a concentração de 10^{-5} M, não houve alteração na Fc de nenhum dos grupos. O aumento na Fc só foi observado na maior concentração testada de 10^{-3} M. Também não foi encontrada qualquer diferença estatística entre os diferentes grupos.

Apesar do aumento de cerca de 50% na Fc observado na concentração de 10^{-3} M, o TPT das tiras não se altera diante das diferentes concentrações. Também não foi encontrada diferença entre os grupos quanto aos valores de TPT com o aumento da adrenalina (Fig. 30). Assim como os dados de TPT, o THR não apresentou variação com o aumento de adrenalina na solução fisiológica. O grupo Digestão, em 10^{-8} M de adrenalina, apresentou uma queda no THR e mostrou-se significativamente menor do que os outros dois grupos. Com o aumento de adrenalina nas preparações, o THR do grupo Digestão volta ao valor inicial e se iguala aos grupos Jejum e Pós-absortivo (Fig. 31).

A adrenalina também afeta a velocidade com que a tiras contraem e relaxam. Até a concentração de 10^{-5} M, as taxa de contração e relaxamento se mantiveram constantes em relação aos valores controle, no entanto, na concentração de 10^{-3} M foi registrado um aumento na velocidade de contração, que é o mesmo para os 3 grupos (Fig. 32). Nesta última concentração, a velocidade de relaxamento também aumenta significativamente nos grupos Jejum e Pós-absortivo. A taxa de relaxamento do grupo Digestão não se altera com o aumento de adrenalina nas preparações, mantendo-se constante em todas as concentrações testadas experimentalmente. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Fig. 33).

Para testar se as alterações decorrentes do estímulo adrenérgico perduram com o aumento na frequência de estimulação, as tiras expostas as concentrações de 10^{-8} M e 10^{-3} M de adrenalina foram submetidas ao contínuo

aumento da frequência estimulatória e os dados foram comparados com o obtido em solução fisiológica controle. Foi observado que a concentração de 10^{-8} M de adrenalina não causou qualquer alteração na Fc dos três grupos testados, sendo igual ao controle em todas as frequências analisadas (Fig. 34A, B e C). As tiras do grupo Jejum submetidas à concentração de 10^{-3} M de adrenalina apresentaram um significativo aumento na força de contração entre as frequências de 0,2 a 0,6 Hz, quando comparadas à situação controle (Fig. 34A). No grupo Digestão este aumento perdura por uma larga escala de frequências estimulatórias, sendo que a partir da frequência de 1,8 Hz, a Fc se iguala à encontrada durante o controle (Fig. 34B). O grupo Pós-absortivo também mostrou um aumento na Fc que permaneceu até a frequência de 0,8 Hz. Em frequências maiores, a Fc se iguala ao obtido durante a solução controle (Fig. 34C). A comparação entre os 3 grupos em solução controle mostrou que a capacidade de geração de tensão é maior no grupo Digestão nas frequências de 0,6 e 0,8 Hz comparado aos outros dois grupos. Em frequências maiores e menores que estas, os valores se igualam e não foi encontrada qualquer diferença entre os regimes de alimentação (Fig. 34D). Na concentração de 10^{-8} M, a comparação dos grupos não mostrou diferença significativa na Fc em nenhuma das frequências testadas experimentalmente. Apenas o retorno imediato a 0,2 Hz foi diferente entre os grupos, mostrando que jejum e digestão retornam com força de contração maior do que a encontrada no grupo Pós-absortivo (Fig.34E). Também não foi observada alteração significativa entre os grupos na concentração de adrenalina de 10^{-3} M, mostrando que a resposta à adrenalina é a mesmo para os 3 grupos mesmo com o aumento na estimulação (Fig. 34F).

Apesar do significativo aumento na capacidade de geração de tensão, o TPT não se altera com o aumento da concentração de adrenalina ou com o aumento na frequência de contração, sendo que em todos os grupos, a resposta de TPT em concentrações de 10^{-8} M e 10^{-3} M de adrenalina foi a mesma registrada em solução fisiológica controle (Fig. 35A, B e C). Nessa situação, o grupo Digestão apresentou um TPT significativamente maior do que o registrado no grupo Pós-absortivo nas frequências de 0,8 Hz, 1,8 Hz e 2,0 Hz. Nas frequências de 1,0 e 1,2 Hz o TPT do grupo Digestão foi maior do que

os outros dois grupos estudados (Fig. 35D). A exposição à concentração de 10^{-8} M fez com que os valores de TPT se iguallassem entre os grupos e não havendo diferença significativa entre eles em nenhuma das frequências testadas (Fig. 35E). Em 10^{-3} M, o grupo Pós-absortivo apresentou um TPT mais elevado comparado aos outros grupos na frequência de 0,2 Hz. O aumento na frequência de estimulação fez com que os grupos se iguallassem entre si até a frequência final de 2,0 Hz (Fig. 35F).

Ao contrário do registrado no TPT, a adrenalina parece exercer um significativo efeito sobre o tempo para a metade do relaxamento das tiras ventriculares dos diferentes grupos. No grupo Jejum, foi observado que o THR durante a concentração de 10^{-8} M de adrenalina mantém-se estável em relação ao controle em todas as frequências testadas experimentalmente. Durante a concentração de 10^{-3} M de adrenalina, ocorre uma significativa redução nos valores de THR em relação ao controle entre as frequências de 0,6 e 1,4 Hz (Fig. 36A). Em frequências maiores do que estas o THR iguala-se entre os grupos e nenhuma diferença foi registrada. No grupo Digestão foi observado que na frequência inicial de 0,2 Hz, o THR das tiras expostas a 10^{-3} M de adrenalina, foi significativamente maior do que o registrado em tiras expostas à 10^{-8} M de adrenalina, na mesma frequência de estimulação. Com o aumento da frequência, foi observado que em 0,6 Hz, ambas as concentrações de adrenalina apresentaram uma redução do TRH em relação à situação controle. Entre 0,8 e 1,2 Hz, o THR das tiras submetidas à preparação de adrenalina 10^{-3} M passou a ser significativamente menor do que o registrado em solução controle (Fig. 36B). Em frequências maiores de que 1,4 Hz, o THR se igualou entre os 3 grupos e não foi encontrada diferença significativa. No grupo Pós-absortivo, não foi registrada diferença entre o grupo controle e o grupo submetido à preparação de 10^{-8} M de adrenalina em nenhuma das frequências testadas (Fig. 36C), no entanto, o grupo exposto à solução de 10^{-3} M de adrenalina apresentou uma redução nos valores de THR quando comparado ao grupo controle que perdurou entre as frequências de 0,4 Hz a 1,0 Hz, sendo que em frequências maiores do que estas, o THR voltou a se igualar e não foi encontrada diferença significativa entre os grupos testados (Fig. 36C). A comparação dos 3 grupo sem solução controle mostrou que grupo Digestão foi

significativamente menor do que o grupos pós absoritivo em uma larga escala de frequências de estimulação (Fig. 36D). O grupo Jejum, por sua vez, foi semelhante a ambos os grupos, mostrando-se maior do que o grupo Digestão apenas na frequência de 1,0 Hz e durante o retorno a 0,2 Hz (Fig. 36D). As tiras expostas a 10^{-8} M e 10^{-3} M de adrenalina, não apresentaram qualquer diferença de THR entre os grupos (Fig. 36E e F).

A velocidade de contração das tiras também foi alterada pela exposição à adrenalina. No entanto, o efeito só foi significativo nas tiras expostas a 10^{-3} M da droga, sendo que a concentração de 10^{-8} M não resultou em alteração quando comparada ao controle em nenhum dos grupos testados. No grupo Jejum, a exposição a 10^{-3} M de adrenalina fez com que a velocidade de contração fosse significativamente maior do que a registrada no grupos controle nas frequências de 0,2 e 0,6 Hz (Fig. 37A). No grupo Digestão, a exposição à alta concentração de adrenalina levou ao aumento na velocidade de contração em relação ao controle entre as frequências de 0,2 a 1,2 Hz, sendo que em frequências maiores, as velocidades de igualam e não foi encontrada diferença significativa (Fig. 37B). O aumento na velocidade de contração também foi observado nas frequências iniciais de 0,2 a 0,6 Hz, nas tiras do grupo Pós-absoritivo, e o aumento na frequência de estimulação fez com que as taxa de igualassem e não foi encontrada diferença entre as concentrações da droga e a solução controle (Fig. 37C). Ao comparar os dados controle dos 3 grupos, não foi encontrada diferença entre os grupos em nenhuma das frequências testadas experimentalmente (Fig. 37D). A comparação dos três grupos alimentares nas diferentes concentrações de adrenalina, também não mostrou diferença entre as taxas de contração sendo que nas duas concentrações testadas não foi encontrada diferença entre os grupos com o aumento na frequência de estimulação (Fig. 37E e F).

A taxa de relaxamento também apresentou alteração em decorrência da exposição à adrenalina. No grupo Jejum, a exposição à adrenalina 10^{-3} M levou à um significativo aumento na velocidade de relaxamento entre as frequências de 0,2 e 0,8 Hz quando comparado à situação controle. Nas frequências 1,4 e 1,6 Hz as tiras expostas à adrenalina 10^{-8} M é que apresentaram aumento na taxa de relaxamento quando

comparada ao grupos controle (Fig. 38A). No grupo Digestão, em todas as frequências de estimulação testadas, as tiras expostas à preparação de 10^{-3} M de adrenalina apresentaram um significativo aumento na velocidade de contração quando comparada às concentrações (Fig. 38B). No grupo Pós-absortivo, entre as frequências de 0,2 e 1,6 Hz, as tiras submetidas à concentração de 10^{-3} M de adrenalina, apresentaram uma velocidade de relaxamento significativamente menor do que a registrada em solução controle (Fig. 38C). A figura 38D ilustra a comparação dos 3 regimes alimentares em situação controle. A análise estatística mostrou que a taxa de relaxamento durante a digestão foi significativamente maior do que a registrada nos outros dois grupos entre as frequências de 0,6 a 2,0 Hz. Quando submetidas à concentração de 10^{-8} M de adrenalina, pode-se perceber que não foi encontrada diferença significativa entre os grupos em nenhuma frequência testada experimentalmente (Fig. 38E). Já na concentração de 10^{-3} M de adrenalina, foi observado que na frequência de 1,0 Hz o grupo Digestão apresentou uma velocidade significativamente maior do que a registrada no grupo Jejum e após a frequência de 1,2 Hz, a taxa de relaxamento do grupo Digestão foi significativamente maior do que a registrada nos outros dois grupos testados (Fig. 38F).

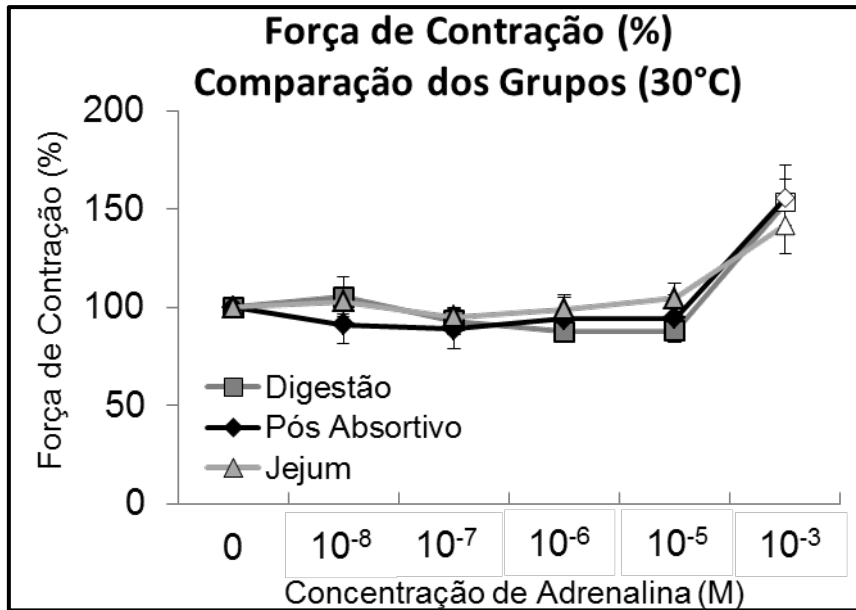


Figura 29. Alteração na força de contração (%) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos dentro da mesma concentração de adrenalina na solução fisiológica (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

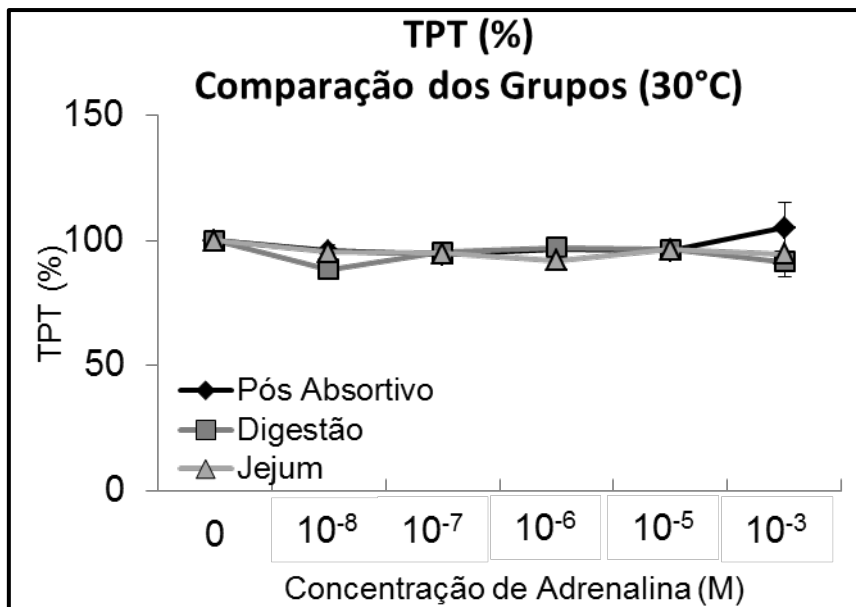


Figura 30. TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são media \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos dentro da mesma concentração de adrenalina na solução fisiológica (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

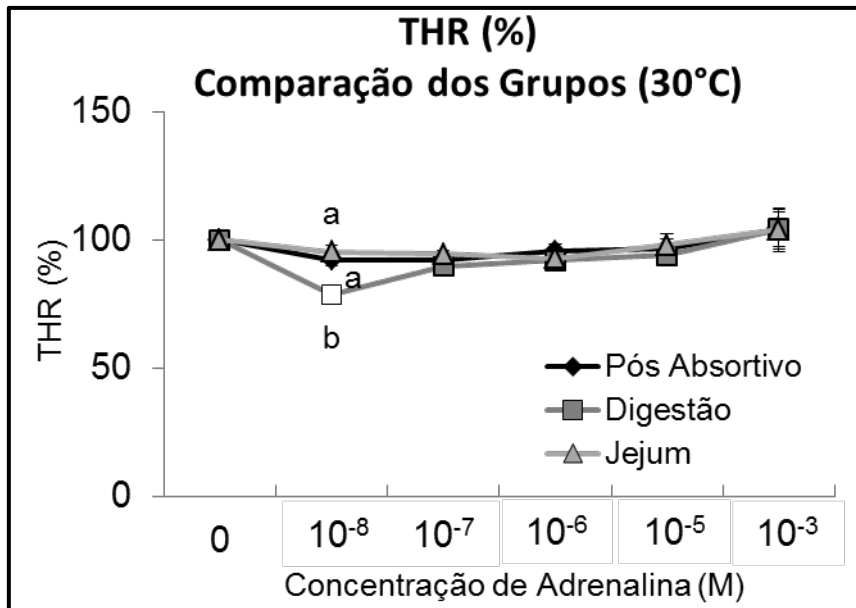


Figura 31. THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos dentro da mesma concentração de adrenalina na solução fisiológica (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

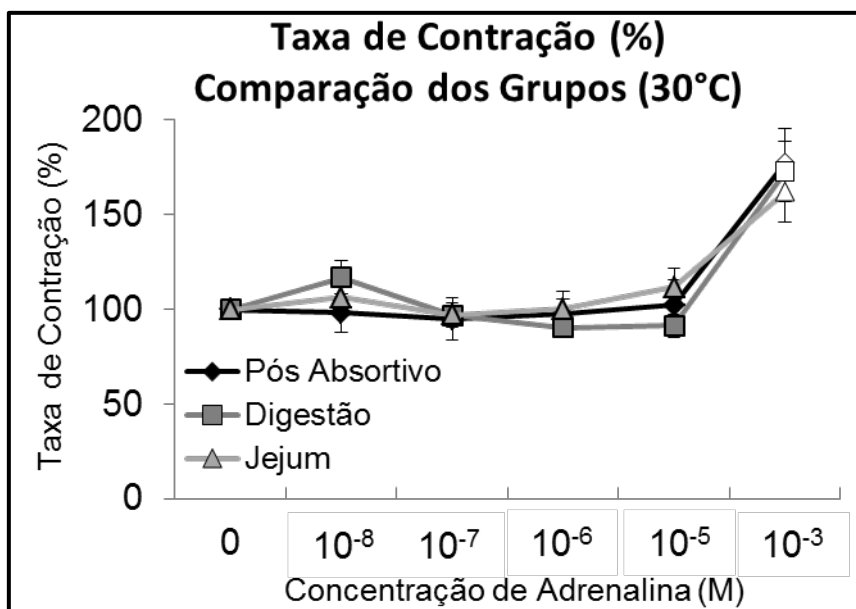


Figura 32. Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos dentro da mesma concentração de adrenalina na solução fisiológica (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

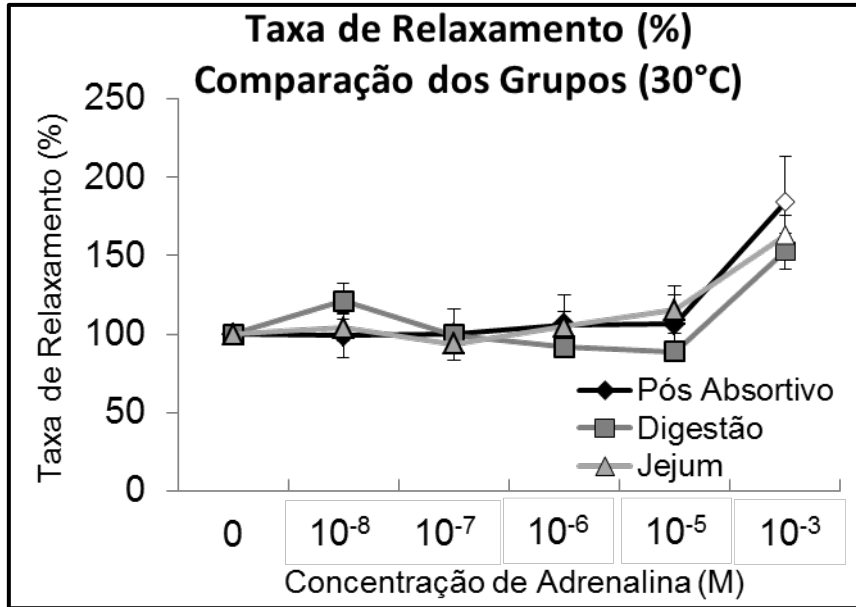


Figura 33. Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em crescente concentração de adrenalina e diferentes regimes de alimentação: Jejum (Δ), Digestão (\square) e Pós-absortivo (\diamond). Os valores são média \pm EPM. Os símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao valor inicial. As letras indicam a diferença significativa entre os grupos dentro da mesma concentração de adrenalina na solução fisiológica (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

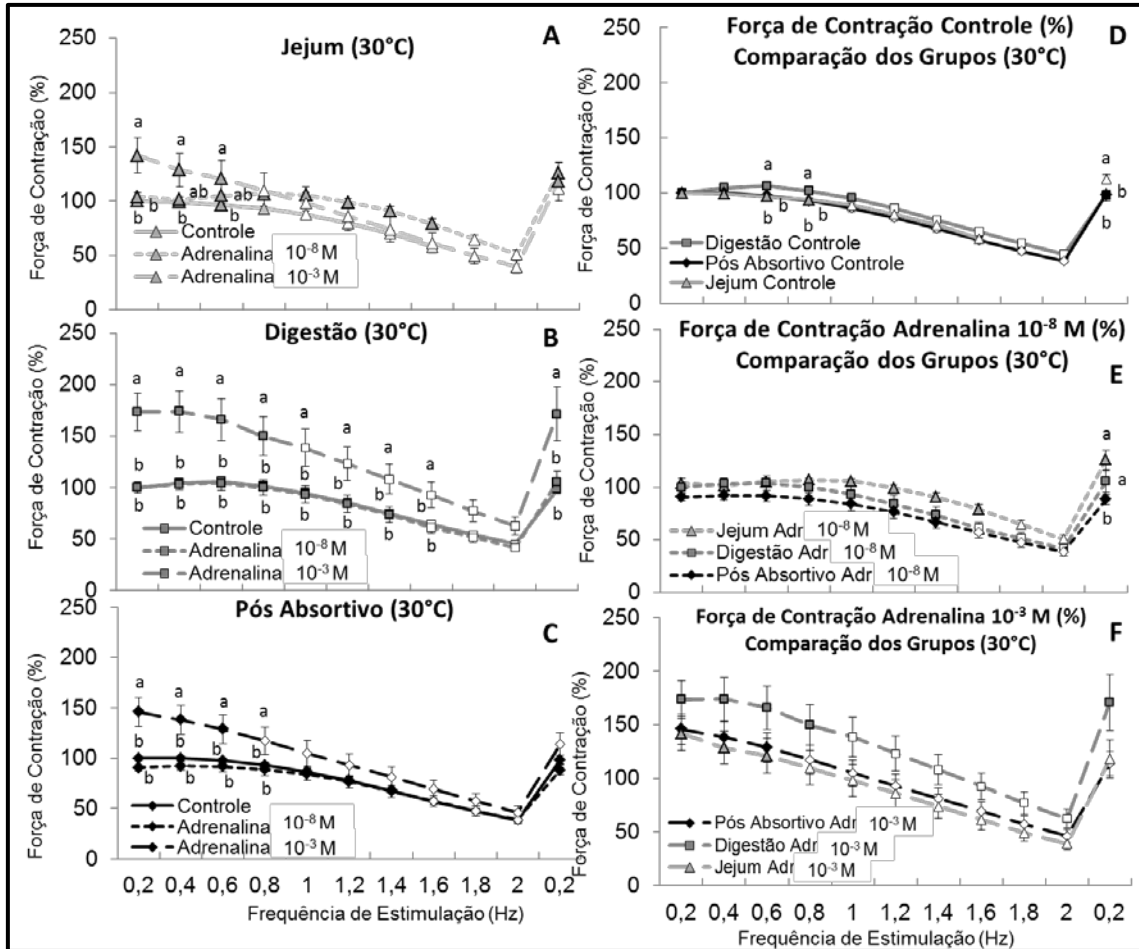


Figura 34. Relação força-frequência (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha completa), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M – linha pontilhada pequena) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M – linha pontilhada grande) nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**), após à exposição à adrenalina 10^{-8} M (**Figura E**) e adrenalina 10^{-3} M (**Figura F**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e os testes com adrenalina (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

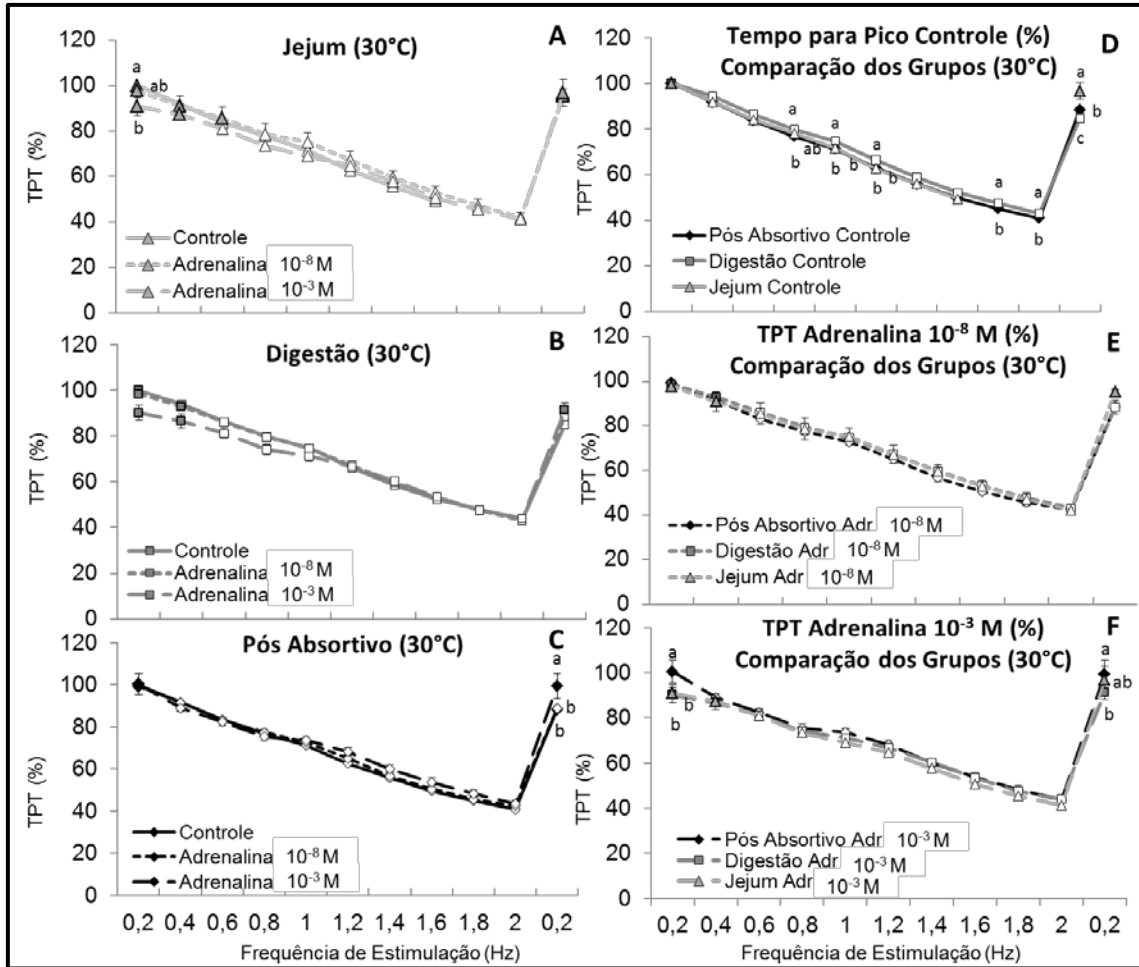


Figura 35. Valores TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha completa), com 10⁻⁸ M de Adrenalina (Adren 10⁻⁸ M – linha pontilhada pequena) e com 10⁻³ M de Adrenalina (Adren 10⁻³ M – linha pontilhada grande) nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (□ - **Figura B**) e Pós-absortivo (◇ - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**), após à exposição à adrenalina 10⁻⁸ M (**Figura E**) e adrenalina 10⁻³ M (**Figura F**). Os valores são média ± EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e os testes com adrenalina (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

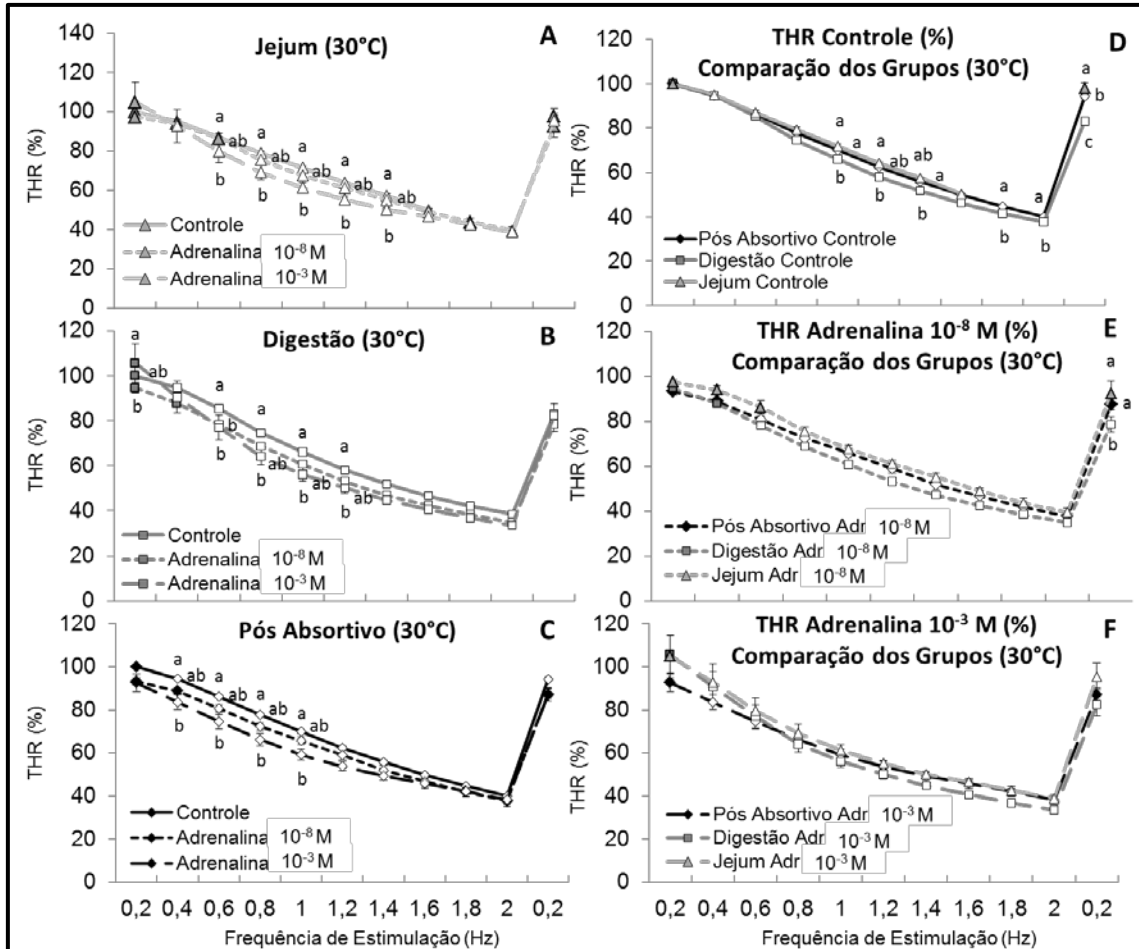


Figura 36. Valores de THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha completa), com 10^{-8} M de Adrenalina (Adren 10^{-8} M – linha pontilhada pequena) e com 10^{-3} M de Adrenalina (Adren 10^{-3} M – linha pontilhada grande) nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (\square - **Figura B**) e Pós-absortivo (\diamond - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**), após à exposição à adrenalina 10^{-8} M (**Figura E**) e adrenalina 10^{-3} M (**Figura F**). Os valores são media \pm EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e os testes com adrenalina (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

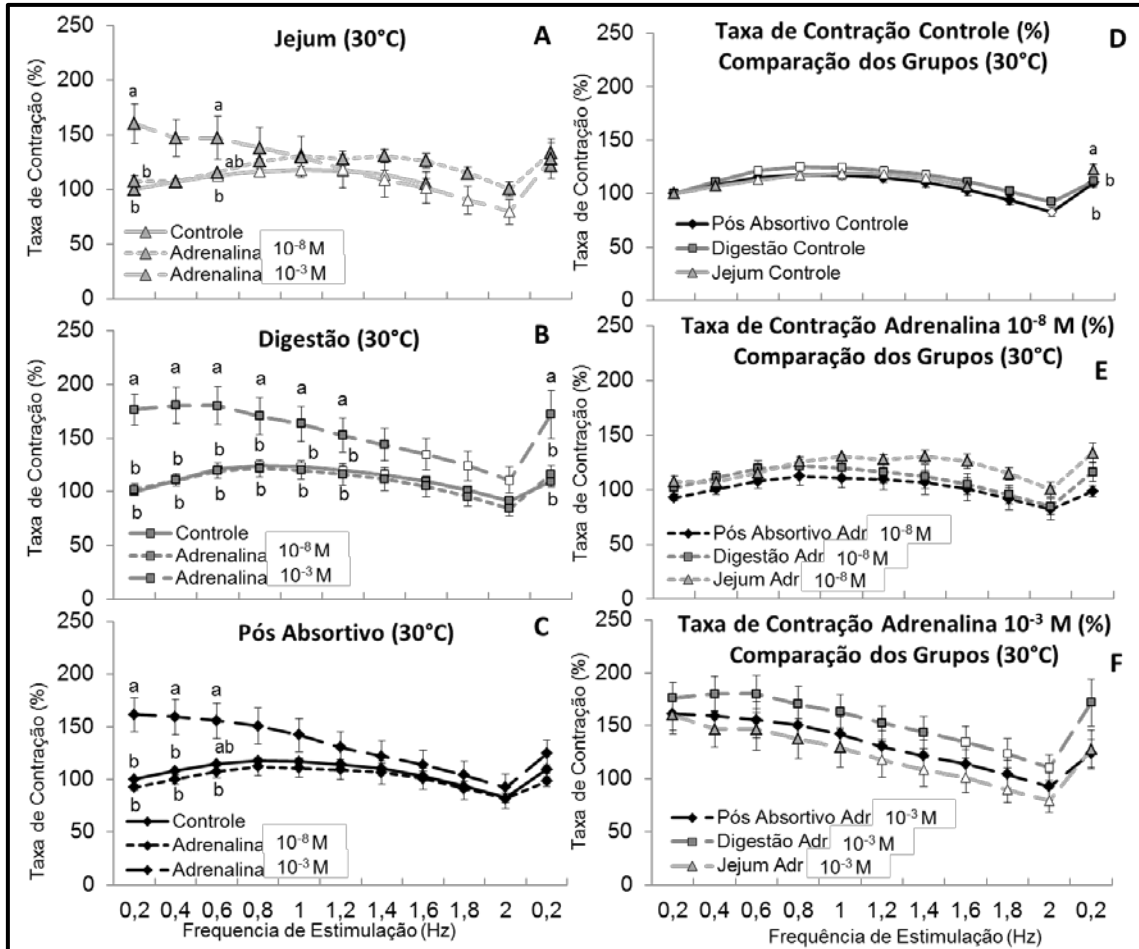


Figura 37. Valores de Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha completa), com 10⁻⁸ M de Adrenalina (Adren 10⁻⁸ M – linha pontilhada pequena) e com 10⁻³ M de Adrenalina (Adren 10⁻³ M – linha pontilhada grande) nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (□ - **Figura B**) e Pós-absortivo (◇ - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**), após à exposição à adrenalina 10⁻⁸ M (**Figura E**) e adrenalina 10⁻³ M (**Figura F**). Os valores são media ± EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e os testes com adrenalina (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

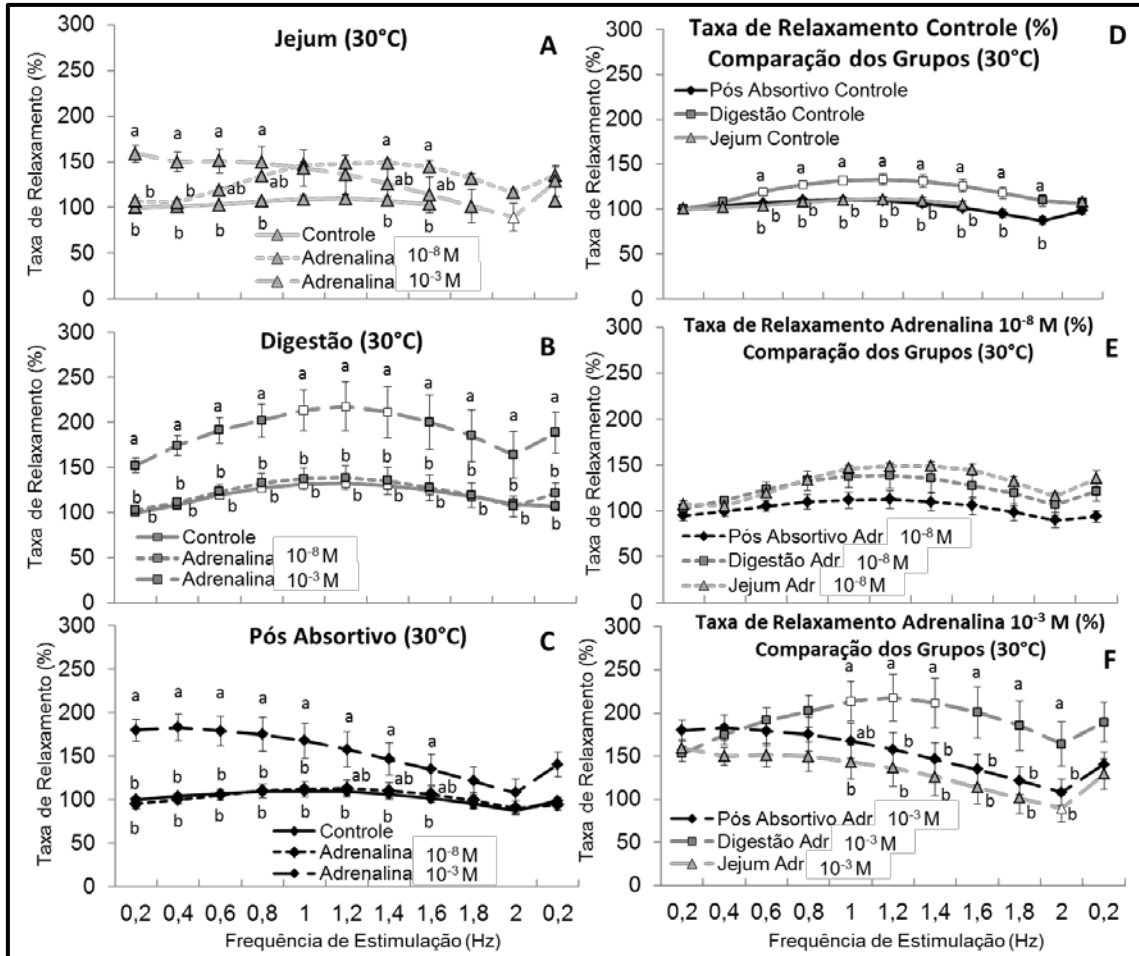


Figura 38. Valores de Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* em solução controle (Controle – linha completa), com 10⁻⁸ M de Adrenalina (Adren 10⁻⁸ M – linha pontilhada pequena) e com 10⁻³ M de Adrenalina (Adren 10⁻³ M – linha pontilhada grande) nos 3 diferentes regimes alimentares testados ao longo dos experimentos: Jejum (Δ - **Figura A**), Digestão (□ - **Figura B**) e Pós-absortivo (◇ - **Figura C**). Também estão ilustrados acima a comparação dos 3 grupos em solução controle (**Figura D**), após à exposição à adrenalina 10⁻⁸ M (**Figura E**) e adrenalina 10⁻³ M (**Figura F**). Os valores são média ± EPM. O sinal * indica diferença entre a força de contração registrada na solução controle e após o aumento do cálcio em cada grupo alimentar. Os símbolos abertos indicam a diferença significativa de força em relação ao valor inicial no mesmo grupo e solução. As letras indicam a diferença encontrada na geração de força entre os 3 regimes de alimentação testados antes e os testes com adrenalina (ANOVA TwoWay, SNK, p<0,05).

11.7. Tensão Pós Pausa de 5 min

Em preparação fisiológica controle, verificou-se que o grupo Pós-absortivo apresentou uma significativa redução na Fc após a pausa de 5 minutos na estimulação. A exposição ao lítio resultou em uma potenciação da Fc em relação aos valores pré-pausa e pós-pausa em solução controle. Em solução contendo rianodina, o grupo Pós-absortivo mostrou uma significativa redução na Fc em relação aos valores pré-pausa, mas não foi diferente da redução observada após a pausa de 5 minutos na estimulação em solução fisiológica controle (Fig. 39). No grupo Digestão, foi observado que a pausa de 5 minutos na estimulação em solução controle levou a uma significativa redução na Fc em relação aos valores obtidos pré-pausa. A substituição do sódio pelo lítio resultou em um significativo aumento na Fc comparada aos valores pré-pausa e pós pausa em solução controle. Em solução contendo Rianodina, foi encontrada significativa redução na Fc em relação aos valores pré-pausa, porém semelhante àquela encontrada em solução controle (Fig. 39). Durante o jejum prolongado, as tiras expostas à pausa estimulatória em solução controle, foi observada redução na Fc em relação aos valores pré-pausa. A exposição ao lítio, assim como nos outros dois grupos, manteve-se constante em relação aos valores pré-pausa, porém significativamente maior do que os valores pós- pausa em solução fisiológica controle. A exposição à solução contendo Rianodina causou uma redução significativa na Fc em relação aos valores pré-pausa, no entanto, manteve-se semelhante aos valores pós-pausa controle (Fig. 39). A comparação dos 3 regimes alimentares dentro de uma mesma solução mostrou que em todas as preparações testadas os 3 grupos responderam da mesma forma, mostrando que o regime de alimentação parece não alterar o efeito pós-pausa em soluções contendo lítio e rianodina (Fig. 39).

A pausa estimulatória também causa modificações nos valores de tempo para o pico de contração. Em solução fisiológica controle foi observado que há um significativo aumento na Fc dos 3 grupos testados em relação quando comparados aos valores pré-pausa. Quando expostas ao lítio, as tiras ventriculares dos grupos pós-absortivo e digestão mantiveram os valores de

TPT semelhantes aos valores pré-pausa e não foi encontrada diferença significativa em relação ao TPT registrado após a pausa estimulatória em solução controle. No grupo Jejum, a exposição ao lítio manteve o TPT estável em relação aos valores pré-pausa, porém foi significativamente menor do que o registrado em solução controle após a pausa de 5 minutos. Em solução contendo Rianodina, o grupo Pós-absortivo apresentou um aumento no TPT em relação ao valor pré-pausa, no entanto não foi encontrada diferença em relação ao pós-pausa em solução controle. Nos outros dois grupos não foram registradas alterações no TPT em relação aos valores pré-pausa ou pós-pausa controle. A comparação dos 3 grupos dentro de uma mesma preparação fisiológica mostrou que em solução controle, o TPT registrado no grupo Jejum foi significativamente maior do que o registrado nos outros dois grupos. Nas demais preparações não foram encontradas diferença entre os grupos testados (Fig. 40).

O THR do grupo Pós-absortivo, em solução fisiológica controle, manteve-se igual aos valores obtidos antes da pausa estimulatória. Na substituição do sódio pelo lítio, o THR deste grupo foi significativamente maior do que os valores obtidos pré-pausa e pós-pausa controle. Por fim, quando expostas à rianodina, as tiras apresentaram valores de THR semelhantes ao controle pós-pausa e pré-pausa (Fig. 41). No grupo Digestão foi observado que, em solução fisiológica controle, ocorreu uma significativa redução no THR em relação aos valores pré-pausa. Quando submetido à solução contendo lítio, o grupo Digestão apresentou um aumento significativo no THR em relação aos valores pré-pausa e pós-pausa em solução controle. Já a exposição à rianodina, levou a uma significativa redução no THR em relação aos valores pré-pausa e pós-pausa controle e pós-pausa lítio (Fig. 41). No grupo submetido ao jejum prolongado, observou-se que a pausa estimulatória de 5 minutos não causou alterações no THR em relação aos valores pré-pausa. O bloqueio do NCX causado pela exposição ao lítio levou a um significativo aumento no tempo para metade do relaxamento em relação aos valores pré-pausa e pós-pausa controle. A exposição à rianodina, assim como observado em solução controle, não apresentou diferença significativa em relação ao controle pós-pausa controle ou pré-pausa (Fig. 41).

A comparação dos três grupos dentro da mesma preparação fisiológica indica que em solução controle, não há diferença significativa entre os regimes de alimentação testados. A resposta ao lítio mostrou que o aumento no THR é mais significativo no grupo Digestão do que o encontrado nos outros dois grupos. E em solução de rianodina, o THR do grupo Digestão foi significativamente menor do que os grupos jejum e pós-absortivo (Fig. 41).

A taxa de contração também foi afetada pela pausa estimulatória. Em todos os grupos foi observada uma redução na velocidade de contração após a pausa estimulatória de 5 minutos em relação aos valores pré-pausa (Fig. 42). Na solução contendo lítio, os três grupos apresentaram um significativo aumento na taxa de contração quando comparados aos valores obtidos pré-pausa e pós-pausa em solução controle (Fig. 42). A redução na taxa de contração, tal como observada em solução controle, também está presente nas tiras expostas à rianodina, sendo que em todos os grupos apresentaram uma taxa de contração significativamente menor do que o obtido pré-pausa, porém semelhantes aos valores pós-pausa em solução controle (Fig. 42). A comparação entre os resultados obtidos nos 3 grupos dentro de uma mesma solução, mostrou que não houve diferença de velocidade de contração em solução fisiológica controle ou contendo rianodina. Já em solução contendo lítio, o grupo submetido ao jejum prolongado apresentou uma velocidade de contração significativamente menor do que a observada pelos outros dois grupos na mesma solução (Fig. 42).

A taxa de relaxamento em solução controle apresentou a mesma resposta nos três grupos após a pausa estimulatória. Foi registrada uma significativa redução na velocidade de relaxamento após a pausa de 5 minutos na estimulação, e esta redução foi a mesma para os três grupos, não sendo encontrada diferença significativa entre eles (Fig. 43). A velocidade de relaxamento também foi semelhante aos valores pré-pausa na solução contendo lítio, nos três grupos alimentares. No grupo Pós-absortivo e Jejum, foi registrada uma taxa de contração significativamente maior do que os valores pós-pausa em solução controle, no entanto, não foi encontrada diferença entre os 3 grupos na mesma preparação (Fig. 43). Em preparações contendo rianodina, todos os 3 grupos apresentaram uma significativa redução em

relação aos valores pré-pausa, no entanto, não há diferença entre os pós-pausa rianodina e pós-pausa controle e nem diferença significativa entre os três grupos em mesma solução de rianodina (Fig. 43).

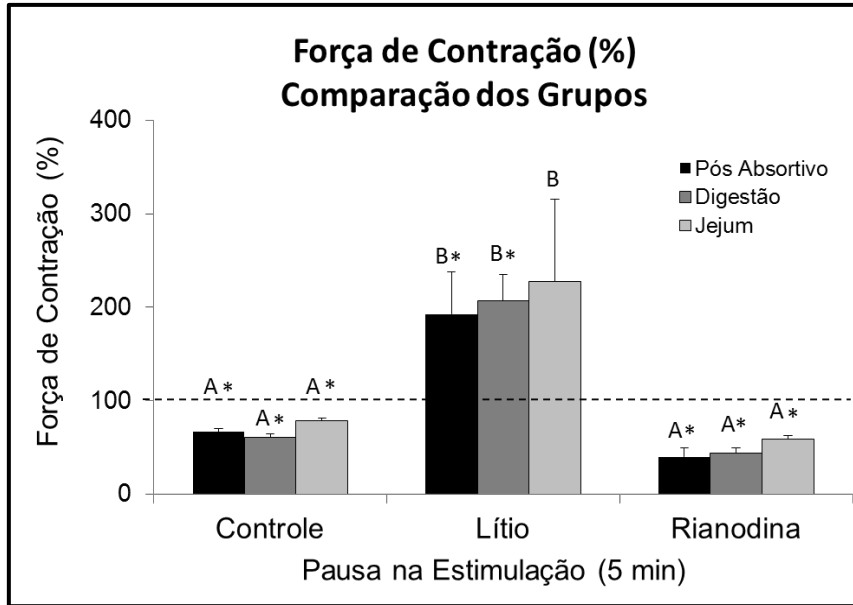


Figura 39. Força de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle, lítio e rianodina após pausa de 5 minutos na estimulação, nos 3 diferentes regimes de alimentação: pós-absortivo (preto), pico de SDA (cinza escuro) e jejum (cinza claro). Os valores são média \pm EPM. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras maiúsculas indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas. As letras minúsculas indicam a diferença entre os grupos em mesma solução fisiológica. A ausência de símbolos indica que não foi registrada diferença entre os pontos (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

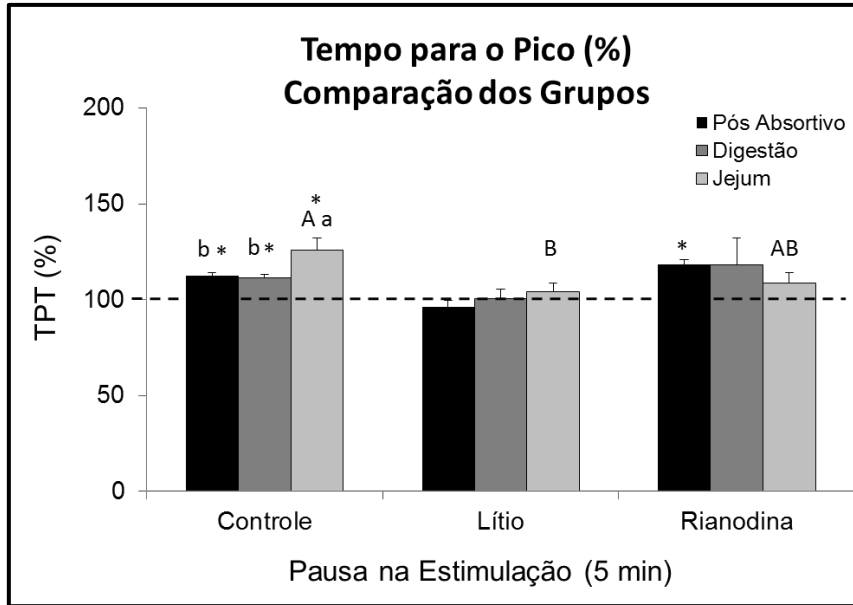


Figura 40. TPT (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle, lítio e rianodina após pausa de 5 minutos na estimulação, nos 3 diferentes regimes de alimentação: Pós-absortivo (preto), Digestão (cinza escuro) e Jejum (cinza claro). Os valores são média \pm EPM. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras maiúsculas indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas. As letras minúsculas indicam a diferença entre os grupos em mesma solução fisiológica. A ausência de símbolos indica que não foi registrada diferença entre os pontos (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

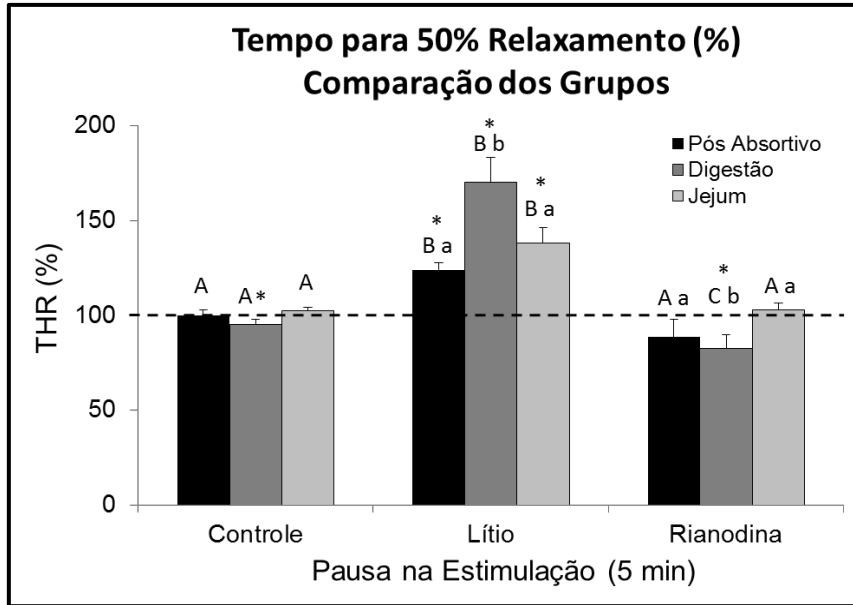


Figura 41. THR (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle, lítio e rianodina após pausa de 5 minutos na estimulação, nos 3 diferentes regimes de alimentação: Pós-absortivo (preto), Digestão (cinza escuro) e Jejum (cinza claro). Os valores são média \pm EPM. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras maiúsculas indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas. As letras minúsculas indicam a diferença entre os grupos em mesma solução fisiológica. A ausência de símbolos indica que não foi registrada diferença entre os pontos (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

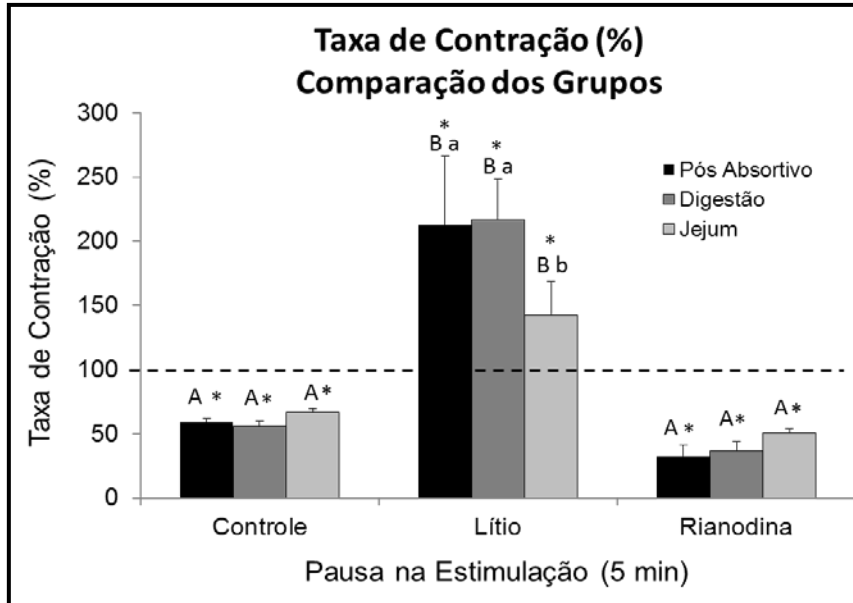


Figura 42. Taxa de Contração (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle, lítio e rianodina após pausa de 5 minutos na estimulação, nos 3 diferentes regimes de alimentação: Pós-absortivo (preto), Digestão (cinza escuro) e Jejum (cinza claro). Os valores são média \pm EPM. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras maiúsculas indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas. As letras minúsculas indicam a diferença entre os grupos em mesma solução fisiológica. A ausência de símbolos indica que não foi registrada diferença entre os pontos (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

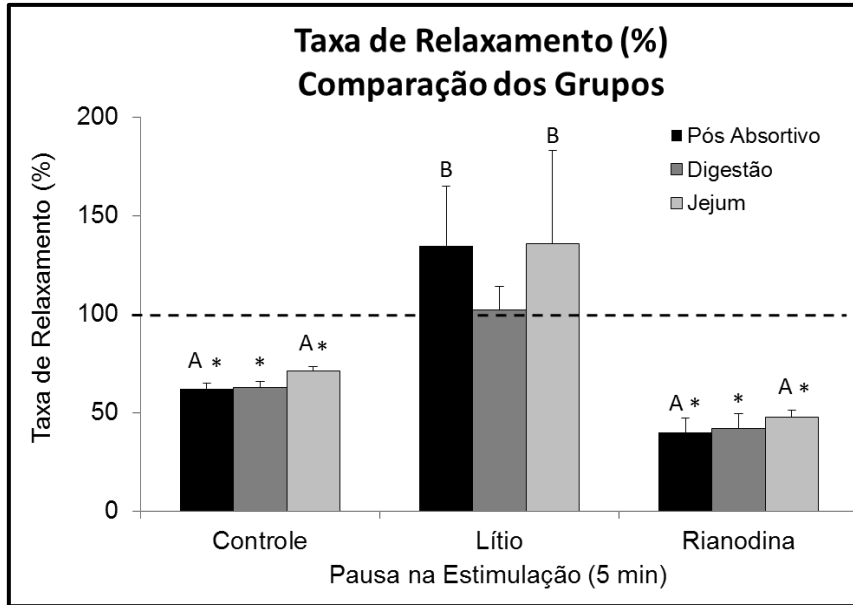


Figura 43. Taxa de Relaxamento (% de alteração) de tiras ventriculares de *C. durissus* expostas à preparação controle, lítio e rianodina após pausa de 5 minutos na estimulação, nos 3 diferentes regimes de alimentação: Pós-absortivo (preto), Digestão (cinza escuro) e Jejum (cinza claro). Os valores são média \pm EPM. A linha pontilhada representa os valores de força de contração das tiras em solução controle antes da pausa estimulatória. Os símbolos * indicam a diferença entre o valor pós-pausa registrado em cada grupo em relação ao valor pré-pausa. As letras maiúsculas indicam a diferença entre os valores pós-pausa nas diferentes soluções fisiológicas. As letras minúsculas indicam a diferença entre os grupos em mesma solução fisiológica. A ausência de símbolos indica que não foi registrada diferença entre os pontos (ANOVA TwoWay, SNK, $p < 0,05$).

12. DISCUSSÃO

12.1. Hipertrofia Cardíaca

Apesar da hipertrofia do miocárdio ser um assunto amplamente estudado em mamíferos como um processo que acontece como forma compensatória ou como consequência do aumento na sobrecarga no coração, e, apesar de ter sido observada em *P. molurus* por Andersen *et al.* (2005), este não foi observado em cascavéis sul-americanas durante o pico de digestão. Nestes animais, aparentemente, o aumento metabólico de cerca de 5 vezes na taxa metabólica padrão após a ingestão de presas correspondentes a 30% da massa corpórea do animais (ANDRADE, 1997) não é suficiente para desencadear um processo de hipertrofia do miocárdio. Já as pítons alimentadas com presas de mesma proporção corpórea (30%) apresentaram um aumento metabólico de 15 vezes da taxa metabólica padrão (SECOR & DIAMOND, 1997a; 1997b; OTT, 2007).

É possível que o aumento metabólico registrado em cascavel não seja suficiente para desencadear a hipertrofia cardíaca registrada em pítons, ou mesmo, que o tempo para que haja toda a reestruturação necessária para hipertrofia seja insuficiente até o pico de digestão, visto que em pítons o pico de digestão ocorre 48h após a ingestão do alimento enquanto em cascavéis acontece após 34 h. Dessa forma, é possível que a hipertrofia ainda não esteja concluída quando o metabolismo atinge o pico em cascavéis, e por isso, não foi registrado aumento significativo. Também é possível que um processo tão complexo como o de hipertrofia ventricular seja um ajuste desnecessário para a espécie, visto que não há redução da capacidade contrátil diante dos extremos metabólicos (jejum e digestão) impostos experimentalmente.

Em situação oposta a de digestão e aumento metabólico, os animais expostos ao jejum prolongado também não apresentaram qualquer alteração na massa ventricular ou atrial. Isto sugere que, apesar da significativa redução na massa corpórea do animal (até 30%), o coração permanece preservado durante todo o processo e a proporção massa do coração por massa corpórea é mantida constante.

12.2. Função Cardíaca durante a Digestão

A diferença na força de contração registrada entre ápice e base descrita no capítulo 1 em animais durante o período pós-absortivo permanece nos animais durante o pico de digestão. É possível notar nos resultados que a força de contração gerada no ápice ventricular do grupo Digestão é significativamente menor do que a registrada em tiras próximas a base no mesmo grupo. Também é observado que não há alteração entre os grupos digestão e pós-absortivo em qualquer das regiões do ventrículo. Estes dados reforçam a ideia de que esta diferença na capacidade de geração de tensão se deve à orientação das fibras e que isso não é alterado em função da demanda metabólica a qual o animal é submetido.

Assim como observado em animais no período Pós-absortivo, o comportamento das tiras de ápice e base ventricular é o mesmo quando normalizados em porcentagem. A comparação dos dados percentuais dos dois grupos (Pós-absortivo e Digestão) em solução fisiológica controle mostra que a força de contração no grupo Digestão é significativamente maior do que a registrada no Pós-absortivo nas frequências de 0,6 e 0,8 Hz e a velocidade de relaxamento é maior no grupo Digestão em praticamente todas as frequências de estimulação testadas durante o experimento. Estes dados sugerem que a ciclagem de cálcio é mais eficiente durante a Digestão se comparada ao regime Pós-absortivo, e que a célula apresenta melhor desempenho na retirada de cálcio livre no citosol.

O bloqueio do RS pela exposição à rianodina causou uma queda na força de contração de cerca de 40% na frequência inicial, semelhante àquela registrada no grupo Pós-absortivo. No entanto, com o aumento na frequência de estimulação, a força de contração aumenta nas frequências de 1,0 e 1,2 Hz, apresentando um valor significativamente maior do que o registrado no grupo Pós-absortivo nas mesmas frequências. Isso pode ser um indicativo de que, durante o pico de digestão, a célula aumenta a sua capacidade de utilizar o cálcio proveniente do meio extracelular para que o bombeamento cardíaco não seja prejudicado em altas frequências de contração e com menor disponibilidade de cálcio.

Além da maior capacidade de utilizar cálcio do meio extracelular, a ciclagem de cálcio também parece ser alterada durante o pico de digestão. O bloqueio do NCX por meio da exposição das tiras ventriculares a uma solução contendo lítio levou a uma redução significativa na força de contração a partir da frequência de 0,6 Hz quando comparados aos valores obtidos em solução controle. Na frequência inicial de 0,2 Hz, não foi observada a redução na força de contração de 20% registrada no grupo Pós-absortivo. Isso pode ser um indicativo de que nesta condição fisiológica, a SERCA está funcionando mais rapidamente do que o NCX na retirada de cálcio livre do citosol. Dessa forma, quando o NCX é bloqueado, mais cálcio é armazenado no RS.

Outra importante alteração em relação ao grupo Pós-absortivo foi a frequência máxima suportada pelas fibras ventriculares. No grupo Pós-absortivo foi observado que a frequência máxima atingida pelas tiras quando o NCX estava bloqueado foi de 0,8 Hz, no entanto, as tiras do grupo Digestão apresentaram capacidade de se contrair em frequências de até 1,0 Hz. Este fato reforça a hipótese de que, durante a digestão e com aumento na disponibilidade de ATP, o bombeamento ativo para a retirada de cálcio livre no citosol é otimizado quando comparado aos animais em regime pós-absortivo.

A ideia de que durante a digestão há um aumento na capacidade de utilização do cálcio extracelular é confirmada pelo experimento onde as tiras foram expostas às crescentes concentrações de cálcio. Foi observado que a força de contração durante a digestão é significativamente maior do que a registrada no grupo Pós-absortivo na concentração mais alta de 10 mM de cálcio. Além disso, a velocidade de contração também é maior nesta concentração e a velocidade de relaxamento é significativamente maior do que a registrada nos animais em período pós-absortivo a partir da concentração de 6 mM. Este também é outro indicativo de que a ciclagem de cálcio é melhorada durante a digestão, visando suprir o aumento na demanda metabólica.

Ao serem submetidas ao crescente aumento na frequência de estimulação, as tiras ventriculares dos animais no pico de digestão e expostas à alta concentração de cálcio (10 mM), apresentaram um aumento na força de contração de cerca de 80% e este perdurou por praticamente todas as frequências de estimulação testadas experimentalmente. Nos animais do grupo

Pós-absortivo foi registrado um aumento na força de contração apenas na frequência inicial de 0,2 Hz, sendo que em frequências maiores a força se iguala àquela obtida em solução controle. Este aumento na força de contração em altas concentrações de cálcio, somado com os resultados obtidos nos testes de rianodina e lítio reforçam ainda mais a hipótese de que a ciclagem de cálcio é melhorada durante a digestão, e ainda acrescentam a hipótese de que, nestes animais, o nível de cálcio circulante no sangue e disponível para a contração do miócito cardíaco é aumentado.

A exposição à adrenalina 10^{-3} M levou a um significativo aumento na força de contração em relação aos valores obtidos em solução controle e este aumento permaneceu durante uma larga escala de frequências de estimulação. Além disso, foi também registrado um significativo aumento na velocidade de relaxamento das tiras quando comparadas aos dados obtidos em solução controle ou aos dados do grupo Pós-absortivo exposto à mesma condição. A estimulação adrenérgica leva a um aumento no influxo de cálcio e melhora na ciclagem e retirada de cálcio do citosol (TIBBITS et al., 1992; SHIELS & FARRELL, 1997), no entanto, o aumento na velocidade de relaxamento durante o pico de digestão também sugere uma melhora na capacidade de ciclagem de cálcio durante situações como esta.

Andersen et al. (2005) mostraram que em *P. molurus* durante o pico de digestão (48 horas após a ingestão do alimento) ocorre um aumento de 40% na massa ventricular e que esta hipertrofia é resultado de um aumento na síntese de proteínas contráteis. Isso ofereceria uma vantagem funcional de aumento na força de contração ventricular diante de um aumento metabólico de até 40 vezes em relação à taxa metabólica padrão. Como observado e discutido no tópico acima, não foi encontrada hipertrofia ventricular ou mesmo atrial em cascavéis durante o pico de digestão. No entanto, se a ciclagem de cálcio é melhorada em função do bombeamento ativo de cálcio, se há um aumento na capacidade de utilização do cálcio extracelular e se a concentração de cálcio circulante no sangue for maior durante o pico de digestão, então torna-se dispensável o aumento do aparato contrátil e da massa ventricular para suprir o aumento metabólico. Entretanto, tal hipótese não descarta a ocorrência de um possível remodelamento na expressão de

proteínas envolvidas no manejo de cálcio, como canais iônicos, bombas e trocadores, nas diferentes condições experimentais.

Apesar das evidências observadas nestes resultados, ainda são necessários testes para a confirmação desta hipótese. Não existe na literatura qualquer dado acerca da concentração de cálcio circulante no sangue de répteis durante a digestão. Isso dificulta a confirmação da hipótese lançada de que ocorre um aumento na quantidade de cálcio livre na circulação destes animais e torna necessária a realização desta investigação. Além disso, é necessário investigar se há de fato um aumento na atividade da SERCA durante a digestão para investigar se há um aumento na capacidade de ciclagem de cálcio e se isso é proveniente do aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase ou do NCX. Isso pode ser testado por meio de análises moleculares ou pela técnica de patch-clamp para averiguar a contribuição de cada um destes componentes na ciclagem de cálcio.

12.3. Função Cardíaca durante o Jejum

Os experimentos com os animais em jejum foram realizados quando os animais perderam 30% da massa corpórea inicial ou quando completaram 1 ano de privação alimentar. Assumiu-se 30% de redução de massa como limite, pois foi visto que, até essa marca, os animais ainda se encontram na fase dois do jejum. Após esta perda de peso, caracterizaria o início da fase 3 e, portanto, preponderância de proteólise e possível comprometimento do músculo cardíaco (Leite, *dados ainda não publicados*). Os animais que não apresentaram tamanha redução de massa foram submetidos ao experimento após 1 ano de privação alimentar pois assumiu-se que seria tempo suficiente para que possíveis ajustes relacionados ao regime alimentar já teriam ocorrido neste período, mesmo que a redução da massa corpórea não tivesse sido tão grande. A diferença na perda de massa corpórea deve-se ao fato de que animais de mesma espécie e mesma necessidade metabólica podem utilizar combustíveis fisiológicos diferentes a fim de suprir a demanda energética (MCCUE, 2010).

Os experimentos *in vitro* mostraram que a diferença entre ápice e base encontrada nos animais bem nutridos apresentados no Capítulo 1 se mantém durante a privação de alimento. Em todas as frequências de estimulação testadas, as tiras próximas à base ventricular desenvolveram maior capacidade de geração de tensão do que as tiras próximas ao ápice. Entretanto, não há diferença na geração de força entre os animais em jejum e os animais pós-absortivo, mostrando que mesmo após um longo período em privação de alimento, o coração permanece íntegro na sua capacidade de bombeamento e geração de força. Os parâmetros de tempo de contração e relaxamento também não foram diferentes entre os animais controle e em jejum, no entanto, a velocidade máxima do ciclo de contração e relaxamento em tiras próximas ao ápice aparentemente é afetado pelo regime de alimentação e foi significativamente menor nos animais em jejum quando comparados aos animais controle em todas as frequências testadas.

A velocidade máxima de contração e relaxamento é calculada pela tangente de inclinação da força de contração em função de tempo. Dessa forma, as contrações podem apresentar o mesmo tempo para o pico e mesmo

tempo para o relaxamento, porém derivadas de força em função do tempo diferentes entre si. Isso pode se dar pela alteração na orientação das fibras próximas ao ápice ventricular em alterações alimentares como digestão ou jejum, não afetando o desempenho das tiras, porém alterando a velocidade de conclusão do ciclo contrátil. No entanto, assim como observado em animais no período pós-absortivo, o comportamento das tiras de ápice e base ventricular é o mesmo quando normalizados em porcentagem, não havendo diferença em função do regime de alimentação.

Outra alteração observada nos resultados foi a redução da capacidade de contração em altas frequências de estimulação após a privação alimentar. Apesar da manutenção da força de contração e dos parâmetros de tempo, as tiras dos animais submetidos ao jejum prolongado suportaram frequências de estimulação até 1,6 Hz enquanto os animais controle suportaram estimulações de até 2,0 Hz. O mau funcionamento das tiras ventriculares em altas frequências de estimulação sugere que a ciclagem de cálcio fica prejudicada durante a privação alimentar. Esta alteração pode estar ligada a um ajuste no suporte enzimático, que afetaria retirada de cálcio do citosol durante altas frequências de estimulação. No entanto, não há na literatura artigos que investiguem a frequência cardíaca de animais nestas condições, e, portanto não é possível afirmar que isto seria uma desvantagem fisiológica para estes indivíduos *in vivo*. No entanto, trabalhos recentes e ainda não publicados do INCT em Fisiologia Comparada mostram que cascavéis submetidas à mesma condição de jejum replicada neste trabalho, são capazes de aumentar a taxa metabólica em até 3 vezes durante exercício forçado ou espontâneo (CLÉO LEITE, *dados ainda não publicados*). Este significativo aumento metabólico deve vir acompanhado de um ajuste na frequência cardíaca e uma alteração na ciclagem de cálcio em altas frequências de estimulação pode ser um fator limitante nestes animais.

A hipótese de que a ciclagem de cálcio é alterada durante o jejum é reforçada no teste de funcionalidade do retículo sarcoplasmático. Os animais submetidos ao jejum apresentaram uma queda significativa (cerca de 20%) na força de contração em relação ao obtido em solução fisiológica controle, porém esta queda foi significativamente menor do que queda a registrada no grupo

controle (cerca de 40%) após o bloqueio dos canais de rianodina (Fig. 9). Esta diferença sugere que, durante o jejum, menos cálcio é armazenado dentro do retículo sarcoplasmático. Isso pode se dar em função da baixa quantidade de ATP disponível para o bombeamento ativo de cálcio via SERCA. Apesar da redução do estoque de cálcio dentro do RS, não há redução na força de contração desenvolvida durante o Jejum quando comparada ao Pós-absortivo em solução fisiológica controle, levantando a hipótese de que o cálcio disponível para a contração se mantém estável mesmo durante a privação alimentar.

O íon cálcio pode entrar na célula por 4 vias: (1) Canais lentos de cálcio presentes na sarcolema, (2) Retículo Sarcoplasmático (RS), (3) trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e (4) Mitocôndria. A liberação de cálcio para a contração do miócito não depende da produção e consumo de ATP, porém o bombeamento de cálcio para fora do citosol pode depender. A retirada de cálcio pode ser feita também por 4 vias: (1) Enzima $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ sarcolemal, (2) $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ presente no RS (SERCA), (3) NCX e (4) transportador “uniporter” mitocondrial. Das 4 vias de retirada de cálcio apresentadas, as duas $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ consomem ATP. Para um animal com deficiência de energia como em privação alimentar, e com baixa produção de ATP, restam duas saídas prioritárias: o NCX e o transportador mitocondrial.

Quando as tiras ventriculares dos animais submetidos ao jejum prolongado foram expostas à solução onde o sódio foi substituído por lítio (bloqueio do NCX), foi observada uma potenciação na força de contração na frequência inicial de 0,2 Hz, enquanto no grupo Pós-absortivo foi observado apenas uma redução de cerca de 20% na força de contração. Com o NCX bloqueado e com menor quantidade de cálcio disponível para contração armazenado no RS, este diferencial de cálcio ativador pode ser proveniente do meio externo, via canais-L ou de um reservatório interno, via mitocôndria. A ideia de um aumento do armazenamento de cálcio dentro da mitocôndria é reforçada se forem consideradas as opções de relaxamento em um quadro de baixa disponibilidade de ATP, e, portanto, baixo bombeamento via $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ e NCX bloqueado pelo lítio. A opção de retirada de cálcio do citosol passaria a se concentrar no transportador uniporter mitocondrial, sugerindo

que, para manter o coração íntegro na sua capacidade contrátil durante o período de privação alimentar, a mitocôndria passa a funcionar como importante armazenador e fornecedor de cálcio para a contração ventricular em cascavéis.

Na literatura, existem trabalhos que mostram a importante participação da mitocôndria na manutenção da homeostase de cálcio celular diante de situações fisiológicas normais, mas a maioria dos trabalhos publicados referem-se a miócitos ventriculares de mamíferos (JEAN-QUARTIER *et al.*, 2012). Contudo, há escassez de trabalhos envolvendo o estudo acerca da importância das mitocôndrias na ciclagem de cálcio do miócitos cardíacos de vertebrados basais. Dessa forma, a comparação de informações entre grupos deve ser feita com cuidado em função da diferença funcional entre os miócitos. Isso dificulta a análise da hipótese apresentada acima de que durante uma situação adversa e com redução de ATP a mitocôndria serviria como um importante reservatório intracelular de cálcio.

Em mamíferos, a mitocôndria tem um papel pequeno na ciclagem de cálcio. O cálcio proveniente do meio extracelular via canais-L é importante, porém insuficiente para manter a contração ventricular. No entanto, é o principal responsável pela ativação dos canais de rianodina e liberação do cálcio armazenado no interior do retículo sarcoplasmático. O NCX funciona apenas como um bombeador de cálcio do meio intra para o extracelular, e assim como a mitocôndria, não fornece quantidades significativas de cálcio para a contração (BERS, 2002). A retirada de cálcio se dá principalmente via SERCA e via NCX, sendo que a Ca^{2+} ATPase sarcolemal e o transportador uniporter mitocondrial constituem o chamado sistema lento de ciclagem de cálcio e apresentam pouca influência para o relaxamento (BASSANI & BASSANI, 2002).

Em humanos com insuficiência cardíaca há uma redução da captação de cálcio pela SERCA e um aumento da atividade do NCX (STÜDER *et al.*, 1994; FLESCHE *et al.*, 1996; HASENFUSS, 1998). De forma direta, a SERCA é capaz de transportar 2 íons cálcio livres no citosol para o RS por cada molécula de ATP consumida. O NCX não consome ATP diretamente para o seu funcionamento, no entanto ele depende do funcionamento da bomba de

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ que bombeia 3Na^+ para fora e 2K^+ para dentro, via ATPase. O NCX trabalha colocando 1 íon Ca^{2+} para fora e 3 íons Na^+ para dentro da célula. Dessa forma, segundo BERS (2000), o NCX consome mais energia para a retirada de cálcio livre do citosol ($1\text{ATP}/\text{Ca}^{2+}$) que a SERCA ($1\text{ATP}/2\text{Ca}^{2+}$). Essa é outra evidencia de que em cascavéis submetidas ao jejum prolongado, a retirada de cálcio deficiente via Ca^{2+} ATPase reticular não é compensada via NCX, indicando que o cálcio deve ser armazenado em um reservado intracelular.

Porém, pelo fato do transportador uniporter da mitocôndria ser considerado mais lento do que os demais e seguindo a teoria de que a mitocôndria funciona como armazenador de cálcio em miócitos cardíacos de cascavéis em jejum, é de se esperar que a velocidade de relaxamento seja menor do que a registrada no grupo controle (BERS, 2000). É possível perceber nos dados apresentados de teste de rianodina que a velocidade de relaxamento dos animais em jejum é igual àquela registrada no grupo controle assim como o registrado no teste de bloqueio do NCX. Como mostrado no capítulo 1, o NCX funciona como o principal bombeador de cálcio citosólico para o meio externo e é mais rápido do que a SERCA. Entretanto, durante o jejum, foi observada uma deficiência no bombeamento de cálcio para o RS e uma menor dependência do cálcio reticular para a contração do miócito. Isso sugere que a SERCA trabalha menos pela deficiência na produção de ATP. No entanto, o bombeamento de cálcio via NCX também é indiretamente custoso e não parece ser alterado para compensar o menor funcionamento da SERCA durante a privação de alimento. Como não há alteração na taxa de relaxamento com o bloqueio dos canais de rianodina, pode-se supor que há uma modificação no transportador uniporter mitocondrial para suprir essa disfunção e, assim, manter estável a função cardíaca. No entanto, essa compensação durante a privação de alimento, se existente, só é observada até a frequência de 1,6 Hz, sendo que em frequências maiores as tiras começam a apresentar deficiência na ciclagem de cálcio e falta de estabilidade nas contrações.

Com o aumento do cálcio extracelular pela adição crescente de cálcio na solução fisiológica, foi observado um significativo aumento na força de contração dos animais submetidos ao jejum prolongado. No entanto, este

aumento foi significativo apenas na frequência inicial de 0,2 Hz, sendo que em frequências de estimulação maiores do que esta, a força de contração se igualou aos valores controle. Também foi observado que a partir da frequência de 1,0 Hz, as tiras não foram mais capazes de contrair regularmente, o que indica que com o aumento da disponibilidade de cálcio, o transportador uniporter mitocondrial não consegue suprir a deficiência de bombeamento via Ca^{2+} -ATPase, e as tiras passam a apresentar deficiência na ciclagem de cálcio em frequências menores do que o normal (1,6 Hz).

Ao serem expostas à adrenalina, as tiras ventriculares dos animais em jejum apresentaram um aumento na força de contração na concentração de 10^{-3} M, que se manteve entre as frequências de 0,2 e 0,6 Hz. A concentração de 10^{-8} M de adrenalina não resultou em aumento na força de contração das fibras. No entanto, assim como na concentração mais alta, causou uma otimização na ciclagem de cálcio, fazendo com que as tiras resistissem à frequências de estimulação de até 2,0 Hz, como registrado para o grupo Pós-absortivo. Isso se dá em função da adrenalina aumentar o influxo de cálcio pelos canais de membrana e aumentar o número de transportadores para a retirada de cálcio. Dessa forma, a célula apresenta maior facilidade de retirar cálcio do citosol, sem consumo de ATP, mesmo que haja mais cálcio entrando na célula para a contração (TIBBITS *et al.*, 1992; SHIELS & FARRELL, 1997).

Os testes realizados averiguando a função cardíaca após uma pausa de 5 minutos na estimulação reforçam as ideias apresentadas acima. Após a pausa na estimulação foi observada uma significativa redução na força de contração semelhante à registrada no grupo Pós-absortivo. Ao serem expostas à rianodina, as tiras ventriculares dos animais submetidos ao jejum também apresentaram redução de força, no entanto, essa redução não foi maior do que a registrada em solução controle, indicando uma baixa dependência do cálcio proveniente do RS para a contração ventricular. O bloqueio com o lítio leva a um aumento médio de cerca de 130% na Fc, porém o desvio padrão elevado não permite que haja diferença significativa em relação aos dados pré-pausa.

Com base em todos os dados apresentados e na discussão acima, pode-se dizer que após um longo período em privação alimentar,

cascavéis sul-americanas são capazes de manter a integridade do coração a fim de suprir a demanda metabólica durante todo este período. Entretanto, a ciclagem de cálcio parece ser alterada em função da baixa disponibilidade de ATP. Foi observado que animais em jejum apresentam menor dependência do cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático do que os animais bem nutridos (pós-absortivo e digestão). Como alternativa para manter a força de contração inalterada, o cálcio que deixa de ser bombeado para o RS via SERCA, podendo ser armazenado na mitocôndria. Esta ideia foi reforçada pelo teste de bloqueio do NCX, onde foi observada uma potenciação na força de contração apenas nos animais em jejum, indicando novamente que o cálcio é armazenado em um reservatório intracelular.

No entanto, ainda é necessária a confirmação desta hipótese por meio do bloqueio do transportador “uniporter” mitocondrial ou por meio da técnica de patch-clamp para medir exatamente a contribuição de cada um destes componentes na ciclagem de cálcio em cascavéis submetidas a longos períodos em privação alimentar.

13. SUMÁRIO

Com base nos resultados apresentados anteriormente, pôde-se verificar que não ocorre hipertrofia ventricular durante o pico de digestão de cascavéis sul-americana, *Crotalus durissus terrificus*, bem como não foi registrada atrofia ventricular após o jejum prolongado (1 ano ou 30% de redução na massa corpórea). Nos 3 regimes de alimentação testados experimentalmente, a massa relativa do ventrículo se manteve constante em relação ao controle (pós-absortivo, 30 dias após alimentação) diante dos extremos metabólicos (digestão e jejum). Isso contraria a hipótese de que o aumento na demanda metabólica em função da digestão geraria uma sobrecarga no sistema contrátil resultando em hipertrofia e que isso levaria a um aumento na função contrátil.

A visão oposta era esperada durante o jejum prolongado. Sabe-se que a privação de alimento por um longo período de tempo resulta em proteólise, e era esperado que o coração, sendo um músculo, sofresse redução da massa pela mobilização de proteína e, conseqüentemente, uma redução da sua capacidade contrátil. Ao contrário do registrado em mamíferos, não foi observada alteração na massa relativa do ventrículo, e também foi observado que o coração permanece íntegro na sua capacidade contrátil, mesmo após a privação alimentar. No entanto, para manter a integridade cardíaca e a função contrátil constante durante os extremos metabólicos, os diferentes grupos utilizam recursos diferentes.

É possível concluir que durante o pico de digestão, há um aumento na capacidade de bombeamento e ciclagem de cálcio, provavelmente pelo aumento na atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase. Durante um aumento metabólico que pode chegar a até 5 vezes a taxa metabólica padrão (para presas de 30% da massa corpórea), a disponibilidade e consumo de ATP aumentam significativamente, e é possível perceber nos resultados apresentados a maior capacidade de retirar cálcio livre no citosol durante a digestão. Esta característica somada ao aumento de cálcio extracelular disponível para a contração levou a um significativo aumento na força de contração que perdurou por praticamente todas as frequências de estimulação

testadas. Tais resultados sugerem a necessidade de realização de testes que mensurem a quantidade de cálcio circulante no sangue durante o pico de digestão bem como de experimentos utilizando a técnica de patch-clamp para averiguar o grau de participação da SERCA na retirada de cálcio livre no citosol. Se ambas as hipóteses forem confirmadas, então não seria necessária a ocorrência de hipertrofia ventricular para suprir o aumento na demanda metabólica, mas apenas o aumento da concentração de cálcio circulante no sangue para a interação actino-miosínica e a resultante melhora na função contrátil.

Em situação oposta, como no jejum prolongado, também não foi registrada redução da função cardíaca, mostrando que mesmo após um longo período de privação alimentar, o coração permanece íntegro na sua função contrátil. No entanto, os recursos utilizados para que esta seja mantida são bastante diferentes da situação controle e durante o pico de digestão. Com a baixa disponibilidade de ATP, foi observado nos dados apresentados que há uma deficiência na ciclagem de cálcio em altas frequências de estimulação e que há uma menor dependência do cálcio proveniente do RS para a contração muscular. Com base nisso, é provável que as mitocôndrias passem a funcionar como importantes fornecedoras de cálcio para a contração em períodos de baixa disponibilidade de energia. Porém, como um transportador mais lento, a mitocôndria não consegue suprir a retirada de cálcio em altas frequências de estimulação e as contrações das tiras ficam irregulares acima de 1,6 Hz.

Para a confirmação dessa hipótese ainda é necessário que se faça novos experimentos para testar a participação de cada componente celular na ciclagem de cálcio após um longo período de privação alimentar por meio da técnica de patch-clamp ou pelo bloqueio do transportador uniporter mitocondrial. Também seria interessante a realização de testes bioquímicos e moleculares que mostrassem o funcionamento da SERCA e o consumo de ATP dos miócitos durante o jejum.

14. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados anteriormente, pode-se concluir que:

- 1- Não ocorre alteração na massa relativa do ventrículo em decorrência da alimentação ou do jejum prolongado.
- 2- A diferença na geração de tensão de tiras próximas à base ventricular em relação às tiras do ápice se mantém nos 3 regimes de alimentação (Fc na base é 3 vezes maior do que no ápice ventricular), não havendo diferença entre os grupos experimentais.
- 3- O aumento na frequência de estimulação causa um decréscimo na força de contração semelhante nos 3 grupos experimentais.
- 4- O RS é funcional e responsável pelo fornecimento de uma significativa porcentagem de Ca^{2+} para a contração do miócito. No entanto, a participação do RS no grupo Jejum foi menor do que nos grupos Pós-absortivo e Digestão.
- 5- A adrenalina aumenta a Fc em função do aumento da disponibilidade de íons Ca^{2+} , e no grupo Digestão, este aumento permanece por uma escala de frequências estimulatórias maior do que nos demais grupos.
- 6- A mitocôndria pode ter uma importante participação na ciclagem de cálcio nos animais submetidos ao jejum prolongado, como armazenadora e fornecedora de cálcio para a contração do miócito.
- 7- Durante a Digestão há uma maior capacidade de utilização do cálcio extracelular para aumento na força de contração em relação aos outros dois grupos testados.

15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A.S. **Estivation in South American amphibians and reptiles.** Braz. J. Med. Biol. Res. 28, 1241–1247. 1995.
- ANDERSEN, J.B., ROURKE, V.J.C., BENNETT, A.F., HICKS, J.W. **Postprandial cardiac hypertrophy in python.** Nature, 434: 37-38, 2005.
- ANDERSON, R.A.; KARASOV, W.H. **Energetics of the lizard *Cnemidophorus tigris* and life history consequences of food-acquisition mode.** Ecological Monographs, 58: 79–110. 1988.
- ANDRADE, D.; CRUZ-NETO, A.; ABE, A.S. **Meal Size And Specific Dynamic Action In The Rattlesnake *Crotalus durissus* (Serpentes: Viperidae).** Herpetologica, 53(4): 485-493. 1997.
- ANVERSA, P.; LEVICKY, V.; BEGHI, C.; MCDONALD, S.L.; KIKKAWA, Y. **Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by strenuous exercise in rat.** Am J Physiol, 243: H85-H91. 1982.
- ANVERSA, P.; LEVICKY, V.; BEGHI, C.; MCDONALD, S.L.; KIKKAWA, Y. **Morphometry of exercise-induced right ventricular hypertrophy in the rat.** Circ Res, 52:57-64. 1983.
- ANVERSA, P.; RICCI, R.; OLIVETTI, G. **Quantitative Structural Analysis of the Myocardium During Physiologic Growth and Induced Cardiac Hypertrophy: A Review.** J Am Coll Cardiol; 7:1140-1149. 1986a.
- ANVERSA, P.; RICCI, R.; OLIVETTI, G. **Coronary capillaries during normal and pathological growth.** Can J Cardiol. (2):104-13. 1986b.
- BANERJEE, S.K., MORKIN, E. **Actin-activated adenosine triphosphatase activity of native and W-ethylmaleimide-modified cardiac myosin from normal and thyrotoxic rabbits.** Circ Res 41: 630-634. 1977.
- BARBOZA, P.S., JORDE, D.G. **Intermittent feeding in a migratory omnivore: digestion and body composition of American black duck during autumn.** Physiol. Biochem. Zool., 74: 307–317. 2001.
- BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M. **Contribution of Ca²⁺ transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats.** AJP: Heart and Circulatory Physiology, 282: H2406–H2413. 2002.

- BENEDICT F. G. **The Physiology of Large Reptiles with Special Reference to the Heat Production of Snakes, Tortoises, Lizards, and Alligators.** Carnegie Inst. Publ., Washington, DC. 1932.
- BERS, D.M. **Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction.** Circulation Research, 87:275-281. 2000.
- BERS, D.M. **Cardiac Excitation-contraction Coupling.** Nature, 415: 195-205. 2002.
- BICEGO, K.C., BARROS, R.C.H., BRANCO, L.G.S. **Physiology of temperature regulation: comparative aspects.** Comp. Biochem. Physiol. 147, 616–639. 2007.
- BLOOD, D.A. **Western Rattlesnake.** Ministry of Environment, Victoria, British Columbia. 1993.
- BLOUIN-DEMERS G.; WEATHERHEAD, P.J. **An experimental test of the link between foraging, habitat selection and thermoregulation in black rat snakes, *Elaphe obsoleta obsoleta*.** Journal of Animal Ecology, 70: 1006–1013.2001.
- BRODY, S. **Bioenergetics and growth.** Reinhold, New York. 1945.
- BROWN, R.P.; GRIFFIN, S. **Lower selected body temperatures after food deprivation in the lizard, *Anolis carolinensis*.** J. Therm. Biol. 30, 79–83. 2005.
- BRYDEN, M.M.; STOKES, G.B. **Metabolism of fatty acids in the southern elephant seal *Mirounga leonina* (L.).** Canadian Journal of Biochemistry. 47 (8): 757–760. 1969.
- CALOIN, M. **Modeling of lipid and protein depletion during total starvation.** American Journal of Physiology, 287: E790–E798.2004.
- CAHILL, G.F. **Starvation in man.** Clinics in Endocrinology and Metabolism, 5: 397–415.1976.
- CASTELLINI, M.A.; REA, L.D. **The biochemistry of natural fasting at its limits.** Experientia 48: 575–582.1992.
- CHEREL, Y., ROBIN, J., LEMAHO, Y. **Physiology and biochemistry of long-term fasting in birds.** Canadian Journal of Zoology, 66: 159–166.1988.
- COOPER, G. **Cardiocyte adaptation to chronically altered load.** Annu. Rev. Physiol 49: 501-518. 1987.

- COULSON, R.A.; HERNANDEZ, T. **Amino acid metabolism in chameleons.** Comparative Biochemistry of Physiology, 25: 861–872. 1968.
- COULSON R.A.; HERNANDEZ T. **Alligator metabolism: studies on chemical reactions in vivo.** Comp. Biochem. Physiol. 74: 1–182. 1983.
- CRUZ-NETO, A.P.; JONES, K.E. **Exploring the evolution of the basal metabolic rate in bats.** Em: Zubaid, A.; McCracken, G.F.; Kunz, T.H. (Eds.) Functional and Evolutionary Ecology of Bats. Oxford University Press, New York, pp. 56–89. 2006.
- DE VOSJOLI, P.; KLINGENBERG, R.; BARKER, T.; BARKER, D. The ball python manual. Advanced vivarium systems, Santee, CA. 1995.
- DORCAS M.E.; PETERSON C.R.; FLINT, M.E.T. **The thermal biology of digestion in rubber boas (*Charina bottae*): physiology, behavior and environmental constraints.** Physiol. Zool. 70: 292–300. 1997.
- DOUCETT, R.R., BOOTH, R.K., POWER, G., MCKINLEY, R.S. **Effects of the spawning migration on the nutritional status of anadromous Atlantic salmon (*Salmo salar*): insights from stable-isotope analysis.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 56: 2172–2180. 1999.
- FANBURG, B.L.; POSNER, B.I. **Ribonucleic acid synthesis in experimental cardiac hypertrophy in rats.** I. Characterization and Kinetics of labeling. Circ. Res. 23: 123-125. 1968.
- FLESCHE, M.; SAXHWEINGER, R.H.G.; SCHIFFER, F.; FRANK, K.; SUDKAMP, M.; KUHN-REGNIER, F.; ARNOLD, G.; BOHM, M. **Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in failing human myocardium.** Circulation. 94:992–1002. 1996.
- FLINK, I.L.; MORKIN, E. **Evidence for a new cardiac myosin species in thyrotoxic rabbit.** FEBS Lett 81: 391-394. 1977.
- FLINK, I.L.; RADER, J.H.; MORKIN, E. **Thyroid hormone stimulates synthesis of a cardiac myosin isozyme.** J Biol Chem 264: 3105-3110. 1979.

- FISLER, J.S. **Cardiac effects of starvation and semi starvation diets: safety and mechanisms of action.** The American Journal of Clinical Nutrition, 56: 230S-4S. 1992.
- GALLI, G.L.J., GESSER, H., TAYLOR, E.W., SHIELS, H.A., WANG, T. **The role of the sarcoplasmic reticulum in the generation of high heart rates and blood pressures in reptiles.** J. Exp. Biol., 209: 1956-1963, 2006.
- GALLI, G.; WARREN, D. E.; SHIELS, H. A. **Ca²⁺ cycling in cardiomyocytes from a high-performance reptile, the varanid lizard (*Varanus exanthematicus*).** American Journal of Physiology, 297: R1636–R1644. 2009.
- GARLAND, T.; BENNETT, A.F.; REZENDE, E.L. **Phylogenetic approaches in comparative physiology.** Journal of Experimental Biology, 208: 3015–3035. 2005.
- GARNETT S. **Digestion, assimilation and metabolism of captive estuarine crocodiles, *Crocodylus porosus*.** Comp. Biochem. Physiol. 90A: 23–29. 1988.
- GOODKIND, M.G.; DAMBACH, G.E.; THYRUM, P.T.; LUCHI, R.J. **Effects of thyroxine on ventricular myocardial contractility and ATPase activity in guinea pigs.** American Journal of Physiology, 226: 66-72. 1974.
- GRANGER, C.B.; KARIMEDDINI, M.K.; SMITH, V.E.; SHAPIRO, H.R.; KATZ, A.M.; RIBA, A.L.; **Rapid ventricular filling in left ventricular hypertrophy.** I. Physiologic hypertrophy. J Am Coll Cardiol. 5:862-868. 1985.
- GROSSMAN, W.; JONES, D.; MCLAURIN, L.P. **Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle.** J Clin Invest. pp. 56-64. 1975.
- HAILEY, A.; DAVIES, P.M.C. **Digestion, specific dynamic action, and ecological energetic of *Natrix maura*.** Herpetological Journal. 1: 159-166. 1987.
- HASENFUSS, G. **Alterations of calcium regulatory proteins in heart failure.** Cardiovasc Res. 37:279–289. 1998.
- HERVANT, F., MEATHIEU, J., DURAND, J. **Behavioral, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in a blind**

- cave-dwelling (*Proteus anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander.** *Journal of Experimental Biology*, 204: 269–281. 2001.
- HERVANT, F.; RENAULT, D. **Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms.** *Journal of Experimental Biology*, 205: 2079–2087. 2002.
- HICKS, J.M.T.; BENNETT, A. **Eat and run: prioritization of oxygen delivery during elevated metabolic states.** *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 144(2-3): 215-224. 2004.
- HUEY R.B. **Temperature, physiology, and the ecology of reptiles.** Em: Gans, C. & F.H. Pough (eds.). *Biology of the Reptilia, Physiology C, Physiological Ecology.* Acad. Press, Ithaca, NY, pp. 25–74. 1982.
- INUI, Y.; OSHIMA, Y. **Effect of starvation on metabolism and chemical composition of eels.** *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, 32: 492-501. 1966.
- JACKSON, C.M. **The Effects of Inanition and Malnutrition upon Growth and Structure.** P. Blakiston's Son & Co., Philadelphia. 1925.
- JANES, D.N.; CHAPPELL, M.A. **The effect of ratio size and body size on specific dynamic action in Adélie penguin chicks, *Pygoscelis adeliae*.** *Physiol Zool* 68:1029- 1044. 1995.
- JEAN-QUARTIER, C. ; BONDARENKO, A. I. ; ALAM, M. R.; TRENKER, M.; WALDECK-WEIERMAIR, M.; MALLI, R.; GRAIER, W. F. **Studying mitochondrial Ca²⁺ uptake - A revisit.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 353(1-2): 114-127. 2012.
- JENSEN, B.; LARSEN, C. K.; NIELSEN, J. M.; SIMONSEN, L. S.; WANG, T. **Change of cardiac function, but not form, in postprandial pythons.** *Comparative Biochemistry and Physiology*, 160(1):35-42. 2011.
- JOBLING, M. **The influences of feeding on the metabolic rate of fishes: a short review.** *J Fish Biol* 18: 385-400. 1981.
- KALARANI, V.; DAVIES, P.S. **The bioenergetic cost of specific dynamic action and ammonia excretion in a fresh-water predatory leech *Hephelopsis obscura*.** *Comp Biochem Physiol* 108A: 862-870. 1994.

- KANNEL WB, GORDON T, OFFUTT D. **Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence, and mortality in the Framingham study.** *Ann. Intern. Med.* 71:89–105. 1969.
- KEYS, A.; BROZEK, J.; HENNSCHEL, A.; MICHELSEN, O.; TAYLOR, HL. **The Biology of Human Starvation.** Minneapolis: The University of Minnesota Press. 1950.
- KLAUBER, L.M., **Rattlesnakes: Their habits, life histories, and influence on mankind.** University of California Press, Los Angeles. 1972.
- KLEIBER, M. **The Fire of Life.** 2^o Edição. Editora R. E. Krieger Pub. Co. Universidade de Michigan. 1975.
- KONARZEWSKI M.; STARCK J.M. **Effects of food shortage and oversupply on energy utilization, histology, and function of the gut in nestling song thrushes (*Turdus philomelos*).** *Physiol. Biochem. Zool.* 73: 416–427. 2000.
- LAKS, M.M.; MORADY, F.; GARNER, D.; SWAN, H.J.C. **Temporal changes in canine right ventricular volume, mass, cell size, and sarcomere length after banding the pulmonary artery.** *Cardiovasc Res* 8: 106-111. 1974.
- LE MAHO, Y.; ROBIN, J.P.; CHEREL, Y. **Starvation as a treatment for obesity: the need to conserve body protein.** *News Physiol. Sci.*, 3: 21–24. 1988.
- LEVY, D., GARRISON, R.J.; SAVAGE, D.D.; KANNEL, W.B., CASTELLI, W.P. **Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.** *N. Engl. J. Med.* 322:1561–66. 1990.
- LILLYWHITE, H.B.; LICHT, P.; CHELGREN, P. **The role of behavioral thermoregulation in the growth energetics of the toad, *Bufo boreas*.** *Ecology* 54: 375–383. 1973.
- LIMAS, C.J. **Calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum in experimental hyperthyroidism (abstract).** *American Journal of Cardiology*, 41: 395. 1978.
- LINDSTEDT, S.L.; BOYCE, S.J. **Seasonality, fasting endurance, and body size in mammals.** *The American Naturalist*, 125: 873–878. 1985.

- LINZBACH, A.J. **Heart failure from the point of view of quantitative anatomy.** Am J Cardiol. 5: 370-382. 1960
- MARTIN, J.H. & BAGBY, R.M. **Effects of fasting on the blood chemistry of the rattlesnake, *Crotalus atrox*.** Comp Biochem Physiol 44A: 813-820. 1973.
- MCCUE, M.D. **Western diamondback rattlesnakes demonstrate physiological and biochemical strategies for tolerating prolonged starvation.** Physiological and Biochemical Zoology 80(1): 25-34. 2007a.
- MCCUE, M.D. Snakes survive prolonged fasting by employing supply-side and demand-side economic strategies. Zoology 110: 318–327. 2007b.
- MCCUE, M.D. **Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 156(1): 1-18. 2010.
- MCCUE M.D.; BENNETT A.F; HICKS, J.W. **The effects of meal composition on specific dynamic action in Burmese pythons (*Python molurus*).** Physiological and Biochemical Zoology, 78 (2): 182–192. 2005.
- MEDUGORAC, I. **Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium.** Cardiovasc. Res. 14:551–554. 1980
- MEERSON, F.Z. **Contractile function of the heart in hyperfunction, hypertrophy, and heart failure.** Circ Res 24/25 (suppl II): 9-81. 1969.
- MORGAN, H.E.; GORDON, E.E.; KIRA, Y.; CHUA, B.H.L.; RUSSO, L.A.; PETERSON, C.J.; MCDERMOTT, P.J.; WATSON, P.A. **Biochemical Mechanisms Of Cardiac Hypertrophy.** Annual Review of Physiology 49: 533-543. 1987.
- MORKIN, E.; ASHFORD, T.P. **Myocardial DNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy.** American Journal of Physiology, 215: 1409-1413. 1968.
- MROSOVSKY, N.; SHERRY, D.F. **Animal anorexias.** Science, 207: 837–842. 1980.
- MUNOZ-GARCIA, A.; WILLIAMS, J.B. **Basal metabolic rate in carnivores is associated with diet after controlling for phylogeny.** Physiological and Biochemical Zoology, 78 (6): 1039–1056. 2005.

- NAVARRO, I.; GUTIERREZ, J. **Fasting and starvation**. Em: Hochachka, P.W.; Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 4. Elsevier, New York, pp. 393–434. 1995.
- OLIVETTI, G.; ANVERSA, P.; LOUD, A.V. **Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat**. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. *Circ Res*. 46:503-512. 1980.
- OTT, B.D.; SECOR, S.M. **Adaptive regulation of digestive performance in the genus Python**. *Journal of Experimental Biology*, 210, pp 340-356. 2007.
- PHILLIPS, A.M., LIVINGSTON, D.L. and DUMAS, R.F. **Effect of starvation and feeding on the chemical composition of brook trout**. *Prog Fish-Cult*, 22: 147-154. 1960
- PIERSMA T.; LINDSTRÖM A. **Rapid reversible changes in organ size as a component of adaptive behavior**. *Trends in Ecology & Evolution*, 12 (4): 134–138. 1997.
- PORTER, W.P.; GATES, D. M. **Thermodynamic Equilibria of Animals with Environment**. *Ecological Monographs*, 39(3): 227-244. 1969.
- RAKUSAN, K.; HRDINA, P. W.; TUREK, Z.; LAKATTA, E. G.; SPURGEON, H. A.; WOLFORD, G. D. **Cell size and capillary supply of the hypertensive rat heart: quantitative study**. *Basic Res Cardiol*, 79(4): 389-95. 1984.
- RANDALL, J.A.; KING, D.K.B. **Assessment and defense of solitary kangaroo rats under risk of predation by snakes**. *Animal Behavior*, 61: 579–587. 2001.
- ROBIN, J.; CHEREL, Y.; GROSCOLAS, R.; LE MAHO, Y. **Metabolic adaptation to long term fasting in male emperor penguins and in king penguin chicks**. *Physiologist* , 26: A30. 1983.
- ROBIN, J.; CHEREL, Y.; GIRARD, H.; GELOEN, A.; LEMAHO, Y. **Uric acid and urea in relation to protein catabolism in long-term fasting geese**. *Journal of Comparative Physiology*, 157B: 491–499. 1987.
- RUDOLPH, A.M. **Fetal and neonatal pulmonary circulation**. *Annu Rev Physiol*. 41:383-395. 1979.

- SCHREIBER, S.S.; ORATZ, M.; ROTHSCHILD, M.A. **Protein synthesis in the overloaded mammalian heart.** American Journal of Physiology, 211: 314-318. 1966.
- SCHREIBER, S.S.; ORATZ, M.; EVANS, C.; REFF, F.; KLEIN, L.; ROTHSCHILD, M.A. **Cardiac protein degradation in acute overload in vitro: Reutilization of amino acids.** Am J Physiol 224: 338-345. 1973.
- SCHWARTZ, K.; BOUVERET, P.; BERCOVICI, J.; SWYNGHEDAUW, B. **An immunochemical difference between myosins from normal and hypertrophied rat hearts.** FEBS Lett 93: 137-140. 1978.
- SECOR, S.M.; DIAMOND, J. **Adaptive responses to feeding in Burmese pythons: pay before pumping.** *J. Exp. Biol.* 198: 1313 -1325. 1995.
- SECOR, S.M.; DIAMOND, J. **Determinants of the post feeding metabolic response in Burmese pythons (*Python molurus*).** *Physiol. Zool.* 70: 202 -212. 1997a.
- SECOR, S.M.; DIAMOND, J. **Effects of meal size on post prandial responses in juvenile Burmese pythons (*Python molurus*).** *Am. J. Physiol.* 272: R902 -R912. 1997b.
- SECOR, S.M.; DIAMOND, J. **A vertebrate model of extreme physiological regulation.** *Nature*, 395: 659 -662. 1998.
- SECOR, S.M.; DIAMOND J. **Evolution of regulatory responses to feeding in snakes.** *Physiol. Biochem. Zool.* 73: 123–141. 2000.
- SECOR, S.M. **Regulation of digestive performance: a proposed adaptive response.** *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 128(3): 565-577. 2001.
- SECOR, S.M. **Gastric function and its contribution to the postprandial metabolic response of the Burmese python, *Python molurus*.** *Journal of Experimental Biology*, 206(10): 1621-1630. 2003.
- SHIELS, H. A.; FARRELL, A. P. **The Effect 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*.** *The Journal of Experimental Biology* 200, 1607–1621. 1997.

- STARCK J.M. **Structural flexibility of the gastro-intestinal tract of vertebrates – implications for evolutionary morphology.** Zool. Anz. 238: 87–101. 1999a
- STARCK J.M. **Phenotypic flexibility of the avian gizzard: rapid, reversible and repeated changes of organ size in response to changes in dietary fibre content.** J. Exp. Biol. 202: 3171–3179. 1999b.
- STARCK , J.M.; BEESE, K. **Structural flexibility of the intestine of Burmese python in response to feeding.** J Exp Biol 204: 325–335. 2001.
- STARCK J. M.; BEESE K. **Structural flexibility of the small intestine and liver of garter snakes in response to feeding and fasting.** J. Exp. Biol. 205: 1377–1388. 2002.
- STARCK, J. M.; MOSER, P.; WERNER, R. A.; LINKE, P. **Pythons metabolize prey to fuel the response to feeding.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 271 (1542): 903-908. 2004.
- STÜDER, R.; REINECKE, H.; BILGER, J.; ESCHENHAGEN, T.; BOHM, M.; HASENFUSS, G.; JUST, H.; HOLTZ, J.; DREXLER, H. **Gene expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchange in end-stage human heart failure.** Circ Res.75:443– 453. 1994.
- TIBBITS, G.F., PHILIPSON, K.D., KASHIHARA, H. **Characterization of myocardial Na⁺-Ca²⁺ exchange in rainbow trout.** Am. J. Physiol., 262(31): C411-C417, 1992.
- VAKILI, B.A.; OKIN, P.M.; DEVEREUX R.B. **Prognostic implications of left ventricular hypertrophy.** *Am. Heart J.* 41:334–41. 2001.
- VAN DIJK, P.L.M.; STAAKS, G.; HARDEWIG, I. **The effect of fasting and refeeding on temperature preference, activity and growth of roach, *Rutilus rutilus*.** Oecologia, 130: 496–504. 2002.
- VITALI-MAZZA, L.; ANVERSA, P.; TEDESCHI, F.; MASTANDREA, R.; MAVILLA, V.; VISIOLI, O. **Ultrastructural basis of acute left ventricular failure from severe acute aortic stenosis in the rabbit.** J Mol Cell Cardiol. 4: 661-671. 1972.
- WANG T.; HUNG, C.C.Y.; RANDALL, D.J. **The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine.** Annu Rev Physiol 68: 223-251. 2006.

- WEIBEL, E.R.. **Oxygen demand and the size of respiratory structures in mammals.** In: Wood SC, Lenfant C, eds. Evolution of Respiratory Processes, Vol. 13. New York, Basel: Marcel Dekker, pp.289-346. 1979.
- WESTERTERP-PLANTENGA, M.S., HEUVEL, E.V.D., WOUTERS, L. and HOOR, F.T. **Diet-induced thermogenesis and cumulative food intake curves as a function of familiarity with food and dietary restraint in humans.** *Physiol Behav* 51:457-465. 1992.
- WIKMAN-COFFELT, J.; KAMIYAMA, T.; SALEL, A.F.; MASON, D.T. **Differential responses of canine myosin ATPase activity and tissue gases in the pressure-overloaded ventricle dependent upon degree of obstruction: Mild versus severe pulmonic and aortic stenosis.** Em "Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism". Vol 12, editado por Kobayashi,T.; Ito, Y.;Rona, G. Baltimore, University Park Press, pp 367-372. 1979.
- WIKMAN-COFFELT, J.; PARMLEY, W.W.; MASON, D.T. **The cardiac hypertrophy process, Analyses of factors determining pathological vs physiological development.** *Circ Res.* 45: 697-707. 1979
- WRIGHT, A.J.A.; HUDLICKA, O. **Capillary growth and changes in heart performance induced by chronic bradycardial pacing in the rabbit.** *Circ Res;* 49:469-478. 1981.
- YUAN, S.H.; HEYMANN, M.A.; RUDOLPH, A.M. **Relationship between ventricular weight, pressure and myocardial blood flow in the newborn piglet.** *Circulation.* 34: 243. 1966.